



TITLE:

受容体を介するneuropeptide
Y(NPY)の作用機序に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

茂里, 康

CITATION:

茂里, 康. 受容体を介するneuropeptide Y(NPY)の作用機序に関する研究.
京都大学, 1993, 博士(工学)

ISSUE DATE:

1993-11-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3073235>

RIGHT:

受容体を介する Neuropeptide Y (NPY) の
作用機序に関する研究

茂 里 康

1 9 9 3

目次

	ページ
緒論	1
第1章　ブタ中膜平滑筋でのNPY受容体の結合部位の解析	33
第2章　平滑筋細胞でのNPY受容体を介する情報伝達系	48
第3章　培養ブタ平滑筋細胞でのNPY受容体の結合部位の解析	61
第4章　NPYのY1受容体にリンクしたGTP結合タンパク質	72
第5章　平滑筋細胞に対するNPYの増殖作用	95
総合結論	105
謝辞	107
発表論文	108

略語

Ach:	acetylcholine
AngII:	angiotensinII
APP:	avian pancreatic polypeptide
B _{max} :	binding sites
BK:	bradykinin
cAMP:	cyclic AMP
EDTA:	ethylenediamine tetraacetic acid
EGTA:	ethylene glycol bis (2-aminoethyl-ether) tetraacetic acid
ET:	endothelin
K _d :	dissociation constant
GABA:	γ -aminobutyric acid
4 α -PDBu:	4-alpha-phorbol 12, 13-dibutyrate
Gpp(NH)p:	5'-guanylylimido diphosphate
GTP- γ -S:	guanosine 5'-0- (3-thiotriphosphate)
HPLC:	high performance liquid chromatography
HPP:	human pancreatic polypeptide
IBMX:	isobutylmethylxanthine
IP ₃ :	inositol 1, 4, 5- trisphosphate

LH:	luteinizing hormone
LHRH:	luteinizing hormone releasing hormone
MPMA:	4-0-methylphorbol 12- myristate 13-acetate
NE:	norepinephrine
NPY:	neuropeptide Y
H-NPY:	human neuropeptide Y
P-NPY:	porcine neuropeptide Y
OAG:	1-Oleoyl-2- acetyl-glycerol
PDBu:	phorbol 12, 13- dibutyrate
PKC:	protein kinase C
PMA:	phorbol 12-myristate 13-acetate
PP:	pancreatic polypeptide
PTX:	pertussis toxin
PYY:	peptide YY
RPP:	rat pancreatic polypeptide

緒論

神経伝達調節物質 neuropeptide Y, peptide YY, pancreatic polypeptide の発見の経緯

免疫化学的及び免疫組織化学的手法が過去20数年間発達することにより、数々の神経伝達調節物質が同定されてきた⁽¹⁾。それらのうちほとんどがペプチドであり、その代表的なものの一つが neuropeptide Y(NPY)である⁽²⁾。1978年にTatemotoはN及びC末端が α -アミド化したポリペプチドの2次元TLCによる同定法を確立し⁽³⁾、続いてブタ小腸からpeptide YY(PYY)と peptide HIを単離精製した⁽⁴⁾。さらに1982年PYYと peptide HIの精製の場合と同様の手法を用いて、ブタ脳からNPYを分離同定した⁽⁵⁾。NPYはこのような化学的検出法により分離同定されたペプチドであるが、アミノ酸配列を決定すると、以前膵臓から分離され、膵液の分泌を抑制することが知られていたpancreatic polypeptide(PP)と極めて構造が類似していた^(5, 6)。NPY, PYY, PPはいずれも36個のアミノ酸よりなる、C末端がアミド化されたペプチドで、これら3つは系統的に共通の祖先遺伝子から生まれた産物であろうと考えられている⁽⁷⁾。PYYはNPYとアミノ酸配列で約70%のホモロジーがあり、主に内分泌細胞や腸管に多く存在している⁽⁸⁾。またPPはNPYと約50%のホモロジーがある⁽²⁾。

NPY, PYY, PPの高次構造は、結晶のX線構造解析により詳しく調べられている^(9, 10)。これらの3つのペプチドは、ポリプロリン2型ヘリックス(1-8番目のアミノ酸), β ターン(9-12番目のアミノ酸), α ヘリックス(13-32番目のアミノ酸), ランダムコイル(33-36番目のアミノ酸)の構造からなっていると考えられている。これらのペプ

チドがとるポリプロリン, β ターン, α ヘリックスの構造はいわゆるPP-foldとも言われている⁽¹¹⁾。

NPYの系統学的保存

NPYは広く各種生物で保存されており、そのアミノ酸配列は、ヒト, ラット, モルモット, ブタ, ウシ, ヒツジ, カエル, トリ, キンギョ, デンキシビレエイなどで確認されている(表1)^(12, 13)。これらの結果によると、脊椎動物の間では10番目のアミノ酸と17番目のアミノ酸が2カ所変化しているだけで、種を越えて非常によく保存されている。トリ, キンギョ, シビレエエイのNPYのアミノ酸配列をラットと比べてみると、それぞれ1, 5, 3カ所しか異なっておらずこれらの間では90%以上のホモロジーが認められる⁽¹²⁾。つまりNPYは神経ペプチドの中でも非常に進化的に保存されているものの一つであり、以上の結果から、生体内でも重要な機能を果たしていることが示唆される。

表1 各生物種内でのNPYのアミノ酸配列

1	5	10	15	20	25	30	35
NPY-human							
Y	P	S	K	P	D	N	P
G	E	D	A	P	A	E	D
M	A	R	Y	Y	S	A	L
R	H	Y	I	N	L	I	T
R	Q	R	Y				
NPY-porcine							
Y	P	S	K	P	D	N	P
G	E	D	A	P	A	E	D
L	A	R	Y	Y	S	A	L
R	H	Y	I	N	L	I	T
R	Q	R	Y				
NPY-sheep							
Y	P	S	K	P	D	N	P
G	E	D	A	P	A	E	D
L	A	R	Y	Y	S	A	L
R	H	Y	I	N	L	I	T
R	Q	R	Y				
NPY-torpedo							
Y	P	S	K	P	D	N	P
G	E	G	A	P	A	E	D
L	A	K	Y	Y	S	A	L
R	H	Y	I	N	L	I	T
R	Q	R	Y				
NPY-goldfish							
Y	P	T	K	P	D	N	P
G	E	G	A	P	A	E	E
L	A	K	Y	Y	S	A	L
R	H	Y	I	N	L	I	T
R	Q	R	Y				
NPY-chicken							
Y	P	S	K	P	D	S	P
G	E	D	A	P	A	E	D
M	A	R	Y	Y	S	A	L
R	H	Y	I	N	L	I	T
R	Q	R	Y				
NPY-rat							
Y	P	S	K	P	D	N	P
G	E	D	A	P	A	E	D
M	A	R	Y	Y	S	A	L
R	H	Y	I	N	L	I	T
R	Q	R	Y				

NPYの分布

1975年臍臓から新しいペプチドホルモンであるPPが発見され⁽⁶⁾、抗体を用いて、その免疫組織化学的分布が詳細に調べられた。その結果、脳にPP様の免疫活性が強いことがわかった。しかしその実体はPPそのものか、それともPPに類似のペプチドであるのか不明であった⁽¹⁴⁾。先に述べた様に、1982年にNPYが発見され、その特異的抗体を用いた研究によって、それまでPP様免疫活性として脳や末梢神経系に存在していたペプチドは実はNPYであることが明らかになった⁽¹⁵⁾。NPYはラット、ヒトの脳の中樞神経系に高濃度かつ広範囲に(視床下部>線条体>大脳皮質>海馬>延髄>中脳)分布している。また末梢では、交感神経系に存在している。このペプチドの分布で一番の特徴は、中樞及び末梢交感神経系どちらも主に、カテコールアミンの一種であるノルエピネフリン(norepinephrine: NE)と共存していることである。

中樞神経系でのNPYの分布

免疫組織化学及びin situ hybridizationの結果によると、NPY様免疫活性は、小脳を除く広範囲の中樞神経系に分布していることがわかっている⁽¹⁶⁾。NPYは延髄のNE/エピネフリン含有細胞であるA1/C1細胞、青斑核のNE含有細胞のA6、エピネフリン含有細胞のC2に存在している⁽¹⁷⁾。特に延髄のC1細胞ではNPYはエピネフリンと共存しており、この部位は血圧調節に重要であることから、中樞神経系を介した、血圧調節におけるNPYの重要な働きが示唆されている⁽¹⁸⁾。またNPYは迷走神経背側核や、中樞での血圧調節の中心である孤束核で、カテコールアミンと共存している^(19, 20)。しかし中脳

のNE含有細胞や、ドーパミン含有細胞ではNPYは存在していない⁽²¹⁾。一般的にNPYはカテコールアミンと共存しているが、その他の神経伝達物質と共存していることも知られている⁽²²⁻²⁴⁾。例えば大脳皮質2-4層にNPY及びNPY mRNAを発現する神経が数多く存在し、これらはソマトスタチンやアミノ酪酸(GABA)と共存し、高次精神機能に関与していることが推察されている⁽²⁵⁾。NPYが中樞神経系で一番多く認められるのは、視床下部である。NPYここでは、視床下部機能、特に多くの視床下部ホルモンの遊離調節に働いていると考えられている⁽²⁶⁾。NPYの中樞神経系での分布で特筆すべきことは、普通の血圧を示すラット(Wistar-Kyoto rat)に比べて、自然発症性高血圧ラット(spontaneously hypertensive rat)では、大脳皮質、中脳、延髄、脊髄においてNPYの量が少ないということである⁽²⁷⁾。またアルツハイマー病の患者では、大脳皮質などのNPY量の低下が確認されている⁽²⁸⁻³⁰⁾。

末梢でのNPYの分布

末梢では、各種動物において、NPYは主に交感神経系に分布し、NEと共存していることが知られている^(31, 32)。NPYはその交感神経への局在性から、交感神経のマーカーペプチドとして見られる場合が度々ある。NPYを含んでいる交感神経系は主に血管を支配しており、静脈より動脈の方がその支配を強く受けることもわかっている⁽³³⁾。また心臓にもNPY含有交感神経は多く、特に心房に多いが、心室にはほとんど存在していないことが知られている^(34, 35)。またNPYは心臓では交感神経以外にも、迷走神経などに一部含まれている⁽³⁶⁾。副腎においては、NE含有クロマフィン細胞に高濃度存在し⁽³⁷⁾、他の神経ペプチドの一種であるエンケファリン(Met-enkephalin)が、エピネフリン含有クロマフィン細胞に局在するのに比べ対照的であ

る。さらに副腎でのNPYの存在部位の詳細な研究によって、クロマフィン細胞内のクロマフィン顆粒にあることがわかっている⁽³⁸⁾。一般的にNPYは交感神経末端の大きなシナプス小胞中にNEと共存している。大きなシナプス小胞は、神経終末のシナプス小胞中の約5%を占め、小さなシナプス小胞がNEだけを含んでいるのとは異なっている⁽³⁹⁾。一般に弱い刺激が神経終末に伝わった場合、まず小さなシナプス小胞から神経伝達物質、例えばNEが放出される。一方強い刺激、そして持続的な刺激が続いた場合にのみ、ようやく大きなシナプス小胞からNEとNPYが放出される⁽⁴⁰⁾。

NPYの中枢に対する作用

(1) NPYの脳皮質に対する作用

NPYは前頭の部分を含む皮質部分に広く分布している⁽⁴¹⁾。この部位は摂食行動、体重の制御、エネルギー代謝に重要であることが知られている。実際NPYを前頭の皮質部分に直接投与したところ、摂食行動の促進と呼吸活動の増加が認められている⁽⁴²⁾。NPYは主にNEと共存し、その遊離を調節していることはよく知られている⁽²⁾。脳皮質のスライスとシナプトソーム画分を用いてNEの遊離に対するNPYの影響が研究されている^(43, 44)。NPYは非刺激時のNE遊離量を抑制も促進もしなかったが、 $\alpha 2$ -アドレノ受容体のアゴニストであるクロニジン(clonidine)によるNEの放出阻害活性を促進した。つまりNPYはNPYの受容体を介して、 $\alpha 2$ -アドレノ受容体の活性化によるcAMP産生阻害活性を増強し、NEの遊離を阻害しているものと考えられる^(45, 46)。

(2) NPYの海馬に対する作用

脳内でNPYの結合活性が一番高いのは海馬である⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾。海馬は記憶学習機能において重要な役割を果たしていることは広く知られている⁽⁵⁰⁾。そこでNPYの記憶に対する影響が調べられた。学習訓練後にNPYを末梢投与した場合記憶保持効果は認められないが、NPYを脳室内投与すると、記憶の保持が促進された⁽⁵¹⁾。また同時に摂食行動が活性化することが知られている⁽⁵²⁾。しかし、NPYのC末端フラグメントであるNPY(20-36)は記憶の保持を促進したが、摂食行動には影響を及ぼさなかった⁽⁵³⁾。つまりNPYのこの2つの中枢神経系に対する作用は、異なる作用点、例えば異なる受容体を介して働いている可能性が強く示唆された。NPYの記憶機能の増強作用は、NPYが抑制性の神経伝達物質であるGABAやvasoactive intestinal polypeptideの遊離を抑制することにより、興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸による神経の発火が起こり易くなるためであろうと考えられている⁽⁵⁴⁾。また摂食行動については、視床下部の受容体を介した作用であることは、以下に述べるようにわかっている。

(3) NPYの視床下部に対する作用

視床下部は本能行動や情動行動の統合中枢であると同時に、内部環境の恒常性維持および外部環境へ適応するための自律神経系、内分泌系、さらには体性神経系も含む多様な機能の中枢でもある⁽⁵⁵⁾。視床下部が果たしている本能行動としては、摂食行動、飲水行動、性行動、体温調節行動などがある。NPYの中枢神経系への作用で忘れてはならないのは、視床下部に対する作用である。免疫組織化学的実験によると、NPYは視床下部に高密度に存在することが知られている⁽⁵⁶⁾。実際NPYを脳室内投与すると、用量依存的に摂食行動と飲水行動の促進が認められた⁽⁵⁷⁾。この作用は、百日咳毒素(pertussis toxin: PTX)で抑制されることから、NPYの受容体、PTX感受性のGTP結合タンパク質を介した作用であることが示唆されている⁽⁵⁸⁾。

またNPYを脳室内投与すると、強力に行動が鎮静化することが知られている⁽⁵⁹⁾。この作用はNPYのC末端フラグメントであるNPY(13-36)では起こらないことから、NPYのいわゆるY1タイプの受容体が介していると考えられている⁽⁶⁰⁾。しかし低濃度のNPY(13-36)では、逆に行動現象の促進が認められる。つまり低濃度のNPY(13-36)によって引き起こされるこの現象は、NPYのY2タイプの受容体を介した作用ではないかと考えられている⁽⁶⁰⁾。またNPYの視床下部を介した内分泌系の作用としては、NPYの黄体形成ホルモン(Luteinizing hormone: LH)の下垂体からの分泌があげられる⁽⁶¹⁾。これはNPYが視床下部上の受容体に結合し、視床下部から黄体形成ホルモンの分泌ホルモン(Luteinizing hormone releasing hormone: LHRH)が放出され、下垂体に働きLHが分泌されることがわかっている⁽⁶²⁾。視床下部でこの作用を介するNPYの受容体はY1タイプの受容体であることが最近確認された⁽⁶³⁾。

(4) NPYの脳幹に対する作用

NPYを脳室内投与すると、血圧、心拍、呼吸数が低下する⁽⁶⁴⁾。NPYは中枢での血圧調節の中心である孤束核で、カテコールアミンと共存しており^(19, 20)、NPYの結合活性が孤束核や最後野の脳幹で多いことが知られている⁽⁶⁵⁾。以上の事実を考え合わせてみて、NPYの中枢神経系を介した循環呼吸系への影響は、孤束核と最後野を介した作用であることが示唆されている。実際直接孤束核にNPYを注入すると、用量依存的に血圧、心拍、呼吸数が低下した⁽⁶⁶⁾。最近孤束核のNPYの受容体が、いままで薬理学的に分けられていたNPYの受容体と異なることが報告された⁽⁶⁷⁾。孤束核のNPY受容体は、ポストシナプスに存在するY1タイプの受容体アゴニストである[Leu31][Pro34]NPYと、プレシナプスに存在するY2タイプの受容体アゴニストであるNPY(13-36)の両方に結合した。しかし驚いたことにPYYには結合しなかった。現在孤束核のNPY受容体は、新しいタイプ

(Y3タイプ)のNPY受容体と考えられている。最後野のNPY受容体は、孤束核に存在する受容体と異なる性質をもつことが知られている⁽⁶⁸⁾。PTX処理すると孤束核のNPY結合活性は約75%増大するが、最後野は影響を受けなかった。つまり2種類の受容体は異なるPTX感受性を持ったGTP結合タンパク質とカップルしていると考えられる。

NPYの末梢に対する作用

NPYは末梢では主に交感神経系でNEと共存し、動脈と静脈にNPY含有神経が投射している⁽⁶⁹⁾。しかし一部心臓などでは非交感神経系に分布し、vasoactive intestinal polypeptideと共存していることが知られている⁽⁷⁰⁾。交感神経を電気刺激したり⁽⁷¹⁾、運動⁽⁷²⁾、ストレス⁽⁷³⁾、出血⁽⁷⁴⁾、低酸素⁽⁷²⁾などで交感神経が刺激された時、末梢の血管系に対してNPYとNEの放出が増加することがわかっている。このNPYの遊離は、細胞外からの Ca^{2+} の流入により、細胞内の Ca^{2+} 濃度が増加することにより起こると考えられている⁽⁷⁵⁾。NPYは交感神経末端の大きなシナプス小胞中にNEと共存している。大きなシナプス小胞は神経終末のシナプス小胞中の約5%を占め、小さなシナプスがNEだけを含んでいるのとは異なっている⁽³⁹⁾。一般に弱い刺激が神経終末に伝わった場合、まず先に小さなシナプス小胞からNEが放出される。一方強い刺激、そして持続的な刺激が続いた場合にのみ、ようやく大きなシナプス小胞からNEとNPYが放出される⁽⁴⁰⁾。つまりストレスや動脈硬化のような持続的な刺激が起きている時の血管状態が、主にNPYで支配されている可能性が高いと考えられる。

(1) NPYの直接的な血管収縮作用

交感神経を電気刺激した後、 α -、 β -アドレノ受容体ブロッカーを

投与しても、血管収縮作用は残っている。この収縮作用の大部分は、NPYによる作用である⁽¹⁵⁾。NPYのこの直接的な収縮作用は、膜電位依存性カルシウムチャンネルブロッカーで阻害されることから、細胞外からの Ca^{2+} の流入が必要であることが示唆されている⁽⁷⁶⁾。

(2) NPYの収縮増強作用

NPYは単独で血管収縮作用があるだけでなく、NEの収縮作用の増強に関与していると考えられている⁽⁷⁷⁾。NPYの収縮増強作用はNEのみならず、ヒスタミン⁽⁷⁸⁾、バソプレッシン(vasopressin)⁽⁷⁹⁾、ATP⁽⁷⁸⁾、アンジオテンシンII(angiotensinII: AII)⁽⁸⁰⁾でも認められる。このNPYの増強作用はシクロオキシゲナーゼ阻害剤であるインドメサシンで阻害されないことから、プロスタグランジンなどのアラキドン酸代謝物によるものでないことがわかっている⁽⁸¹⁾。しかしこの増強作用は、PTX処理でなくなることから、PTX感受性のGTP結合タンパク質を経由した作用であることが知られている⁽⁸²⁾。以上のことから、NPYの増強作用は、NEによる情報伝達系をセカンドメッセンジャーの段階などで増強することによると考えられている⁽⁸³⁾。

(3) 交感神経系における神経伝達物質の放出に対するNPYの作用

NPYの血管系に対する第3番目の作用は、交感神経系のプレシナプスに働いて、神経伝達物質であるNEなどの放出を抑制する作用である⁽⁸⁴⁾。実際NPYは用量依存的にNEの遊離を抑える作用が確認されている⁽⁸⁵⁾。NPYのC末端フラグメントであるNPY(13-36)にはNPYと同程度のNEの遊離抑制作用が認められている。しかし直接の血管収縮作用はNPYでは起こるが、NPY(13-36)では見られない。つまりプレシナプスで働いてNEの遊離を抑えるNPYの受容体と、ポストシナプスで働いて血管を直接収縮させるNPYの受容体は異なるNPYのC末端フラグメントに対する親和性を持つことが示唆されている⁽⁸⁶⁾。実際プレシ

ナプスにあるNPYの受容体はY2タイプ、ポストシナプスにある受容体はY1タイプと命名されている⁽⁸⁶⁾。

(4) NPYの副腎に対する作用

副腎髄質をクロム塩で処理すると、副腎皮質は染まらず髄質だけが褐色に着色する。この着色反応を呈する細胞群はクロム親和細胞と呼ばれている。副腎のクロム親和細胞は、主にエピネフリンとNEを分泌する細胞の2種から成り立っている⁽⁵⁵⁾。NPYは副腎では主に、NE含有クロム親和細胞に存在している⁽⁸⁷⁾。この結果はNPY自体が分泌顆粒からエクソサイトーシスで細胞外に放出される事を示唆している。副腎還流システムを用いて調べられた結果、内臓神経から放出されたアセチルコリン(acetylcholine: Ach)がニコチンAch受容体を刺激し、クロム親和細胞からNPYを還流液中に放出することが明らかになった⁽⁸⁸⁾。このようにニコチンAch受容体刺激で、NEと共にNPYが放出されるが、NPYはこのNEの遊離にどのように作用するかが次に調べられた⁽⁸⁹⁾。NPYはニコチンによるNE及びエピネフリン遊離を両方とも同様に抑制した。しかし、無刺激時の基本的な遊離量あるいは高カリウム刺激時の遊離量には影響を与えなかった。さらにNPYの関連ペプチドについて調べられたところ、ヒトPP(HPP)、トリPP(APP)、PYYの中で、HPPにNPYと同様の強いNE遊離抑制作用が認められた。実際 $[^3H]$ NPYを用いた結合実験により、ウシ副腎髄質膜画分にはNPYの特異的結合部位が存在し、NPYとHPPに対しては同程度の高い親和性を有していたが、PYYではかなり弱い結合しか認められなかった。最近になりこのPYYに対する親和性の低いNPYの受容体は、今までのY1, Y2タイプとは異なるY3タイプであると提唱された⁽⁹⁰⁾。

NPYの受容体

(1) Y1受容体とY2受容体

NPY受容体のサブタイプについては、NPYのアナログを用いた各種NPYのアッセイ系の結果からその存在が提唱されている⁽⁹¹⁾。最初はNPYのC末端フラグメントであるNPY(13-36)を用いた実験の結果から示された⁽⁸⁶⁾。NPY(13-36)は輸精管を電気刺激した時の収縮をNPYと同程度に阻害するが、各種血管に対しては直接収縮活性がない。つまりNPY(13-36)はプレシナプスでの神経伝達物質の放出阻害活性はNPYと同程度であるが、ポストシナプスでの収縮活性はNPYよりも格段に弱いということである。そこでプレシナプスにあるNPY(13-36)に親和性の高いNPYの受容体はY2タイプ、ポストシナプスにあるNPY(13-36)に親和力のない受容体はY1タイプと命名された。次にNPYの受容体を単一発現している各種培養細胞を用いて、NPY受容体が詳しく解析された。放射能ラベルしたNPYとNPY(13-36)などのNPYのアナログを用いた結合実験から、Y1受容体を高発現している代表的な細胞としては、神経腫瘍細胞PC12, SK-N-MC⁽⁹²⁾とCHP212があることがわかった⁽⁹³⁾。またY2受容体を発現している神経腫瘍細胞としては、SMS-MSN, SMS-KAN, CHP-234, SK-N-BE(2)などがある^(93, 94)。Y2受容体が高発現しているラット海馬膜画分とY1受容体が発現しているSK-N-MC細胞を使い、放射能ラベルしたNPYを用いてクロスリンク実験を行ったところ、Y2受容体は分子量が約50000の糖タンパク質で、Y1受容体は分子量が約70000の糖タンパク質であることがわかり、両者は明らかに違ったものであることが示された⁽⁹⁵⁾。

(3) Y3受容体

ウシ副腎髄質膜画分にはNPYの特異的結合部位が存在し、NPYに対しては高い親和性を示すが、PYYに対してはかなり弱い結合しか認められていない⁽⁸⁹⁾。最近になりこのPYYに対する親和性の低いNPYの

受容体は、今までのY1, Y2タイプとは異なったY3タイプであると提唱された⁽⁹⁰⁾。また心室の膜画分による結合実験の結果、ここにもPYYに感受性の低いY3タイプの受容体が存在することが示唆されている⁽⁹⁶⁾。

NPY受容体のアゴニスト, アンタゴニスト

(1) NPY受容体アゴニスト

各種NPYのアナログを用いて、各受容体に特異的なアゴニストが開発されている⁽⁹⁷⁾。Y1に特異的なアゴニストとしては、31番目のアミノ酸をイソロイシン(Ile)からロイシン(Leu)に、34番目のアミノ酸をグルタミン(Gln)からプロリン(Pro)に変化させた[Leu31, Pro34]NPYが知られている⁽⁹⁸⁾。この人工ペプチドはPPとNPYのアミノ酸配列を比較し、Y1, Y2の生物活性と照らしあわせて合成されたものである。34番目のアミノ酸だけをGlnからProに変化させた[Pro34]NPYもY1受容体特異的なアゴニストであることもわかっている⁽⁹⁹⁾。Y2受容体アゴニストとしてはもちろん、NPYのC末端フラグメントNPY(13-36)がある。またサイクリックなNPYのアナログである[cys2, 8-aminooctanoic acid5-24, D-cys27]-NPY(C2-NPY)はY2受容体の特異的なアゴニストである⁽¹⁰⁰⁾。

(2) NPY受容体アンタゴニスト

1990年 α -アドレノ受容体の非可逆的なアンタゴニストであるベネクストラミン(benextramine)が、NPYのアンタゴニスト作用があることが報告された⁽¹⁰¹⁾。このアンタゴニスト作用は、 α -アドレノ受容体に対するよりも、100倍以上の濃度が必要なため、非特異的であ

ると考えられていた。実際この化合物は、NPYのY2受容体の結合を阻害するが、システインなどのアミノ酸残基のSH基に直接作用することがわかっており⁽¹⁰²⁾、SH基に対する化学修飾剤の様な働きをして、NPYの結合を阻害すると考えられている。ヒスタミンのH2受容体のアゴニストであり、H1受容体のアンタゴニストであるHe90481に、NPY受容体のアンタゴニスト活性があることが報告されている⁽¹⁰³⁾。しかし、この化合物もIC50値が数十 μ Mと高く、特異的なアンタゴニストとは言えない。最近イノシトール1, 4, 5, 三リン酸の異性体であるD-ミオ-イノシトール1, 2, 6, 三リン酸(PP56)はエンドセリン、ヒスタミン、ブラジキニン、NE、PGF2 α による収縮を抑制しないが、NPYの収縮作用を特異的に阻害することが報告されている⁽¹⁰⁴⁾。しかし、NPYの結合を阻害しないことから⁽¹⁰⁵⁾、受容体アンタゴニストではなく、受容体以降のNPYの情報伝達系を阻害していると考えられている。ペプチド性のアンタゴニストとしては、NPYのフラグメントペプチドの合成段階で副産物として得られたPYX-1とPYX-2の二つがあり⁽¹⁰⁶⁾、IC50値はいずれも数十nMで、かなり強いアンタゴニストであることが知られている。またNPYのC末端フラグメントの一つであるNPY(18-36)が、Y3受容体ではアンタゴニストであるが、Y1受容体では部分的なアゴニストで、Y2受容体ではアゴニストであることもわかっている⁽¹⁰⁷⁾。

NPY受容体を介した情報伝達系

GTPのアナログを用いた結合実験の結果から、NPY受容体にはGTP結合タンパク質がカップルしていることが知られている⁽¹⁰⁸⁾。

(1)Y1受容体を介した情報伝達系

NPYはY1受容体と抑制性のGTP結合タンパク質を介して、adenylate cyclaseの活性化剤であるフォルスコリンによるcAMP産生を抑制することが知られている⁽¹⁰⁹⁾。

(2)Y2受容体を介した情報伝達系

プレシナプスに存在しているY2受容体は、神経伝達物質の放出を抑制する^(84, 110)ことから、電位依存性カルシウムチャンネルとの関係が指摘され、その後の研究の結果、NPYがY2受容体とGTP結合タンパク質Goを介して、N型カルシウムチャンネルを阻害していることが報告されている^(111, 112)。

本論文の目的

上に述べたように、NPYは末梢では交感神経系に分布し、交感神経系の代表的な神経伝達物質であるNEと共存しており、NEによる血管収縮作用を増強するだけでなく、それ自身強い収縮作用を示すことがわかっている。NPYの血管収縮作用は、交感神経終末から放出されたNPYが、平滑筋細胞上のNPYの受容体に結合することにより作用すると考えられる。そこでNPYの受容体のアンタゴニストを開発すると、それは新たな作用点を持つ高血圧治療薬になる可能性がある。アンタゴニストの探索を行う前に、まずNPYの受容体の構造と、受容体を介したNPYの作用機序の解析が必要である。そこでNPYの特に血管収縮に関与している平滑筋上のNPY受容体と、その受容体を介した情報伝達系について平滑筋細胞と平滑筋細胞と同種のNPY受容体が発現している神経腫瘍細胞を用いて調べることにした。

(1)ブタ中膜平滑筋でのNPY受容体の結合部位の解析

放射能ラベルしたNPY($[^{125}\text{I}]\text{NPY}$)を用いて、ブタ中膜平滑筋の膜画分でのNPY受容体の結合部位の解析を行い、平滑筋のNPY受容体の性質を調べた。

(2)平滑筋細胞でのNPY受容体を介する情報伝達系

一般的な平滑筋の収縮は、刺激により細胞内 Ca^{2+} が上昇し、ミオシンL鎖キナーゼが活性化し、ミオシンL鎖がリン酸化されて収縮が起こる。NPYの場合平滑筋では、cAMPの産生抑制が見られているだけで、NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度への直接的な影響をみた例はない。そこで平滑筋細胞における、細胞内 Ca^{2+} 濃度に対するNPY受容体を介したNPYの影響を調べた。

(3)培養ブタ平滑筋細胞でのNPY受容体の結合部位の解析

(2)の実験の結果、ブタ培養平滑筋細胞で、NPYが細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と、cAMP産生阻害を起こすことがわかった。次にその作用を引き起こすNPYの受容体の性質を知るために、結合部位の解析を行うことにした。

(4)NPYのY1受容体にリンクするGTP結合タンパク質

(2)(3)の実験の結果、NPYはY1タイプの受容体とPTX感受性GTP結合タンパク質を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇とcAMP産生抑制という二つの情報伝達系にかかわる作用を持つことがわかった。そこでこれらの二つの異なる情報伝達系に關与するGTP結合タンパク質の異同を解析した。

(5)平滑筋細胞に対するNPYの細胞増殖作用

交感神経系を弱く刺激すると、先ずNEが小さなシナプス小胞から遊離され血管は収縮する。一方強い刺激、あるいは持続的な刺激の場合にのみ、ようやく大きなシナプス小胞からNEとNPYが放出される。つまりストレスや動脈硬化のような持続的で強い刺激が起きている時の血管状態が、主にNPYで支配されている可能性が高いと考えられる。(2-4)の実験の結果、平滑筋細胞に対し、NPYは平滑筋細胞上のY1タイプの受容体に結合し、異なるPTX感受性GTP結合タンパク質を介して細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇とcAMP産生抑制という二つの情報伝達系にかかわる作用を持つことがわかった。この作用はNPYの短時間の作用である。次にNPYが動脈硬化の発症という長時間の作用に関わっているかどうか調べることにした。動脈硬化の発症の初期には、平滑筋の遊走と増殖が起こり、動脈硬化が進展することが知られている。そこでNPYが動脈硬化の発症という長時間の作用に関わっているかどうか知るため、平滑筋に対するNPYの増殖作用を調べた。

文献

- 1) Hokfelt, T. Neuropeptides in Perspective: The last ten years. *Neuron*, 7(1991)867-879
- 2) Emson P. C. and DeQuidt M. E. NPY-a new member of the pancreatic polypeptide family. *Trends Neurosci.*, 11 (1984)31-35
- 3) Tatemoto, K. and Mutt, V. Chemical determination of polypeptide hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75(1978)4115-4119
- 4) Tatemoto, K. and Mutt, V. Isolation of two novel candidate hormones using a chemical methods for finding naturally occurring polypeptides. *Nature*, 285(1980) 417-418
- 5) Tatemoto, K., Carlquist, M. and Mutt, V. Neuropeptide Y- a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 296(1982) 659-660
- 6) Kimmel, J., Hayden, J. and Pollock, H. Isolation and characterization of a new pancreatic polypeptide hormone. *J. Biol. Chem.*, 250(1975)9369-9376
- 7) Minth, C., Andrews, P. and Dixon, J. Characterization, sequence, and expression of the cloned human neuropeptide Y gene. *J. Biol. Chem.*, 261(1986) 11974-11979
- 8) Lundberg, J., Tatemoto, K., Terenius, L., Hellstrom, P., Mutt, V. and Hamberger, B. Localization of peptide YY (PYY) in gastrointestinal endocrine cells and effects on intestinal blood flow and motility. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA.*, 79(1982) 4471-4475
- 9) Allen, J., Novotny, J., Martin, J. and Heinrich, G. Molecular structure of mammalian neuropeptide Y: analysis by molecular cloning and computer-aided comparison with crystal structure of avian homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84(1987)2532-2536
- 10) Glover, I., Barlow, D., Pitts, J., Wood, S., Tickle, I., Blundell, T., Tatemoto, K., Kimmel, J., Wollmer, A, Strassburger, W. and Zhang, Y. Conformational studies on the pancreatic polypeptide hormone family. *Eur. J. Biochem.*, 142(1985)379-385
- 11) Minakata, H., Taylor, J., Walker, M., Miller, R. and Kaise, E. Characterization of amphiphilic secondary structure in neuropeptide Y through the design, synthesis, and study of model peptides. *J. Biol. Chem.* 264(1989)7907-7913
- 12) Blomqvist, A., Soderberg, C., Lundell, I., Milner, R. and Larhammar, D. Strong evolutionary conservation of neuropeptide Y :sequence of chicken, goldfish, and *Torpedo marmorata* DNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89(1992)2350-2354
- 13) Sillard, R., Agerberth, B., Mutt, V. and Jornvall, H. Sheep neuropeptide Y: a third structural type of a highly conserved peptide. *FEBS. Lett.*, 258(1989)263-265
- 14) Sundler, F., Hakanson, R., Ekblad, E., Uddman, R. and Wahlested, C. Neuropeptide Y in the peripheral adrenergic and enteric nervous systems. *Int. Rev. of cytology*, 102(1986)243-269
- 15) Lundberg, J. and Tatemoto, K. Pancreatic polypeptide family (APP ,BPP, NPY and PYY) in relation to

- sympathetic vasoconstriction resistant to α -adrenoceptor blockade. *Acta. Physiol. Scand.*, 116(1982)393-402
- 16) Allen, J., and Bloom, S. Neuropeptide Y: A putative neurotransmitter. *Neurochem. Int.*, 8(1986)1-8
- 17) Everitt, B., Hokfelt, T., Terenius, L., Tatemoto, K., Mutt, V. and Goldstein, M. Differential co-existence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat. *Neuroscience*, 11(1984)443-462
- 18) Dampney, R., Goodchild, A. and McAllen, R. Vasomotor control by subretrofacial neurons in the rostral ventrolateral medulla. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 65(1987)1572-1579
- 19) Hokfelt, T., Lundberg, J., Lagercrantz, H., Tatemoto, K., Mutt, V., Lindberg, J., Terenius, L., Everitt, B., Fuxe, K., Agnati, L. and Goldstein, M. Occurrence of neuropeptide (NPY)-like immunoreactivity in catecholamine neurons in the human oblongata. *Neurosci. Lett.* 36(1983)217-222
- 20) Hokfelt, T., Lundberg, J., Tatemoto, K., Mutt, V., Terenius, L., Polak, J., Bloom, S., Sasek, C., Elde, R. and Goldstein, M. Neuropeptide Y(NPY) and FMRFamide neuropeptide-like immunoreactivities in catecholamine neurons of the rat medulla oblongata. *Acta. Physiol. Scand.*, 117(1983)315-318
- 21) Potter, E. Neuropeptide Y as autonomic neurotransmitter. *Pharmacol. Ther.*, 37(1988)251-273
- 22) Hendry, S., Jones, E. and Emson, P. Morphology, distribution and synaptic relations of somatostatin- and

- neuropeptide Y- immunoreactive neurons in rat and monkey neocortex. *J. Neurosci.*, 4(1984)2497-2517
- 23) Chronwall, B., Chase, T. and O'Donohue, T. Coexistence of neuropeptide Y and somatostatin in rat and human cortical and rat hypothalamic neurons. *Neurosci. Lett.*, 52(1984)213-217
- 24) Blessing, W. Central neurotransmitter pathways for baroreceptor-initiated secretion of vasopressin. *News Physiol. Sci.*, 1(1986)90-91
- 25) Higuchi, M. Neuropeptide Y. *Folia pharmacol. japon.*, 93(1989) 203-218
- 26) Kalra, S., Dube, M., Sahu, A., Phelps, C. and Kalra, P. Neuropeptide Y secretion increase in the paraventricular nucleus in association with increased appetite for food. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88(1991)10931-10935
- 27) Maccarrone, C. and Jarrott, B. Differences in regional brain concentrations of neuropeptide Y in spontaneously hypertensive(SH) and Wistar-Kyoto(WKY) rats. *Brain Res.*, 345(1985)165-169
- 28) Allen, J., Ferrier, I., Roberts, G., Cross, A., Adrian, T., Crow, T. and Bloom, S. Elevation of neuropeptide Y (NPY) in substantia innominata in Alzheimer's type dementia. *J. Neurol. Sci.*, 64(1984)325-331
- 29) Chan-Palay, V., Lang, W., Allen, Y., Haesler, U. and Polak, J. II. Cortical neurons immunoreactive with antisera against neuropeptide Y are altered in Alzheimer's type dementia. *J. Comp. Neurol.* 238(1985) 390-400
- 30) Beal, M., Mazurek, M., Chattha, G., Svendsen, C., Bird, E. and Martin, J. Neuropeptide Y immunoreactivity

- is reduced in cerebral cortex in Alzheimer's disease.
Ann. Neurol., 20(1986)282-288
- 31)Edvinsson, L., Hakanson, R., Wahlestedt, C. and Uddman, R. Effects of neuropeptide Y on the cardiovascular system. Trends Pharmacol. Sci., 8(1987) 231-235
- 32)Lundberg, J., Trenius, L., Hokfelt, T., Martling, C., Tatemoto, K., Mutt, V., Polak, J., Bloom, S. and Goldstein, M. Neuropeptide Y(NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. Acta. Physiol. Scand., 116 (1982)477-480
- 33)Ekblad, E., Edvinsson, L., Wahlestedt, C., Uddman, R. and Hakanson, R. Neuropeptide Y co-exist and co-operate with noradrenaline in perivascular fibers. Regul. Pept., 8(1984)225-235
- 34)Gu, J., Adrian, T., Tatemoto, K., Polak, J., Allen, J. and Bloom, S. Neuropeptide tyrosine(NPY): a major cardiac neuropeptide. Lancet, 1(1983)1008-1010
- 35)Uddman, R., Ekblad, E., Edvinsson, L., Hakanson, R. and Sundler, F. Neuropeptide Y immunoreactivity in peripheral vascular nerve fibers of the guinea pig. Regul. Pept., 10(1985)243-257
- 36)Hassall, C. and Burnstock, G. Neuropeptide Y-like immunoreactivity in cultured intrinsic neurones of the heart. Neurosci. Lett., 52(1984)111-115
- 37)Allen, J., Adrian, T., Polak, J. and Bloom, S. Neuropeptide Y(NPY) in the adrenal gland. J. Auton. Nerv. Syst., 9(1983)559-563
- 38)Majane, E., Alho, H., Kataoka, Y., Lee, C. and Yang, H.

- Neuropeptide Y in bovine adrenal glands: distribution and characterization. Endocrinology, 117(1985)1162-1168
- 39)Kandel, E., Schwartz, J. and Jessel, T. Chemical messengers: small molecules and peptides. Principle of neural science. Third edition. Elsevier, (1991)213-224
- 40)Lundberg, J., Rudehill, A., Sollevi, A., Theodorsson-Norheim, E. and Hamberger, B. Frequency- and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen. Neurosci. Lett., 63 (1986)96-100
- 41)Chronwall, B., DiMaggio, D., Massari, V., Pickel, V., Ruggiero, D. and O'Donohue, T. The anatomy of neuropeptide Y containing neurons in rat brain. Neuroscience., 15(1985)1159-1181
- 42)McGregor, I., Menendez, J. and Atrens, D. Metabolic effects of neuropeptide Y injected into the sulcal prefrontal cortex. Brain Res. Bull., 24(1990)363-367
- 43)Widdowson, P., Masten, T. and Halaris, A. Interactions between neuropeptide Y and alpha2-adrenoceptors in selective rat brain regions. Peptides, 12(1991)71-75
- 44)Yokoo, H., Schlesinger, D. and Goldstein, M. The effect of neuropeptide Y on stimulation of [3H]NE from rat hypothalamic and cerebral cortical slices. Eur. J. Pharmacol., 143(1987)283-286
- 45)Westlind-Danielsson, Uden, A., Abens, J., Andell, S. and Bartfai, T. Neuropeptide Y receptors and the inhibition of adenylate cyclase in the human frontal and temporal cortex. Neurosci. Lett., 74(1987)237-242
- 46)Widdowson, P. and Hararis, A. Effects of neuropeptide Y

- on alpha 1- and beta-adrenoceptor-stimulated second messenger systems in rat frontal cortex. *Peptides*, 12(1990)661-665
- 47) Busch-Sorensen, M., Sheikh, S., O'Hare, M., Tortora, O., Schwartz, T. and Gammeltoft, S. Regional distribution of neuropeptide Y and its receptor in the porcine central nervous system. *J. Neurochem.*, 52(1989)1545-1552
- 48) Inui, A., Oya, M., Okita, M., Inoue, T., Sakatani, N., Morioka, H., Shii, K., Yokono, K., Mizuno, N. and Baba, S. Peptide YY receptors in the brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150(1988)25-32
- 49) Quirion, R., Martel, J., Dumont, Y., Cadieux, A., Jolicœur, F., St-Pierre, S. and Fournier, A. Neuropeptide Y receptors: autoradiographic distribution in brain and structure-activity relationships. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 611(1990)58-72
- 50) Bliss, T. and Collingridge, G. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361(1993)31-39
- 51) Flood, J., Hernandez, E. and Morley, J. Modulation of memory processing by neuropeptide Y. *Brain Res.*, 421(1987)280-290
- 52) Stanley, G. and Leibowitz, S. Neuropeptide Y injected in the paraventricular hypothalamus: a powerful stimulant of feeding behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82(1985)3940-3943
- 53) Flood, J. and Morley, J. Dissociation of the effects of neuropeptide Y on feeding and memory: evidence for pre- and post-synaptic mediation. *Peptides*, 10(1989)963-966
- 54) Morley, J. and Flood, J. Neuropeptide Y and memory processing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 611(1990)226-231
- 55) 本郷利憲, 広重力, 豊田順一, 熊田衛. 標準生理学. 医学書院
- 56) Chronwall, B., DiMaggio, D., Massari, V., Pickel, V., Ruggiero, D. and O'Donohue. The anatomy of neuropeptide Y containing neurons in rat brain. *Neuroscience*, 15(1985)1159-1181
- 57) Leibowitz, S. Hypothalamic neuropeptide Y, galanin and amines: concepts of co-existence in relation to feeding behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 575(1989)221-235
- 58) Change, W., Sheriff, S., Foley-Nelson, T., Fisher, J. and Balasubramaniam, A. Pertussis toxin inhibits neuropeptide Y-induced feeding behavior in rats. *Peptides*, 10(1989)1283-1286
- 59) Helig, M. and Murison, R. Intracerebroventricular neuropeptide Y(NPY) suppresses home cage and open field activity in the rat. *Reg. Pep.*, 19(1987)221-231
- 60) Helig, M., Wahlestedt, C. and Widerlov, E. Neuropeptide Y(NPY)-induced suppression of activity in the rat: evidence of NPY receptor heterogeneity and for interaction with alpha-adrenoceptor. *Eur. J. Pharmacol.*, 157(1988)205-213
- 61) Kalra, S. and Crowley. Norepinephrine-like effects of neuropeptide Y on LH release in the rat. *Life Sci.*, 35(1984)1173-1176
- 62) Kalra, S., Sahu, P., Kalra, P. and Crowley, W. Hypothalamic Neuropeptide Y: a circuit in the regulation of gonadotropin secretion and feeding behavior. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 611(1990)273-283
- 63) Kalra, S., Fuentes, M., Fournier, A., Parker, S. and Crowley, W. Involvement of the Y-1 receptor subtype in

- the regulation of Luteinizing Hormone secretion by neuropeptide Y in rats. *Endocrinology*, 130(1992)3323-3330
- 64) Fuxe, K., Aganti, L., Harfstrand, A., Zini, I., Tatemoto, K., Pich, E., Hokfelt, T., Mutt, V. and Terenius, L. Central administration of neuropeptide Y induced hypotension, bradypnea, and EEG synchronisation the rat. *Acta Physiol. Scand.*, 118(1983)189-192
- 65) Nakajima, T., Yashima, Y. and Nakamura, K. Quantitative autographic localization of neuropeptide Y receptors in the rat lower brainstem. *Brain Res.*, 380(1986)144-150
- 66) Kubo, T. and Kihara, M. Modulation of the aortic baroreceptor reflex by neuropeptide Y, neurotensin and vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 342(1990)117-120
- 67) Grundemar, L., Wahlestedt, C. and Reis, D. Neuropeptide Y acts at an atypical receptor to evoke cardiovascular depression and to inhibit glutamate responsiveness in the brain stem. *J. Pharmac. exp. Ther.*, 258(1991)633-638
- 68) von Euler., Fuxe, K., van der Ploeg, I., Fredholm, B. and Aganti, L. Pertussis toxin treatment counteracts intramembrane interactions between neuropeptide Y receptors and alpha2-adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.*, 172(1989)435-441
- 69) Gu, J., Polak, J., Allen, J., Huang, W., Sheppard, M., Tatemoto, K. and Bloom, S. High concentrations of a novel peptide, neuropeptide Y, in the innervation of mouse and rat heart. *J. Histochem. Cytochem.*, 32(1984)462-472
- 70) Suzuki, N., Hardebo, J., Kahrstrom, J. and Owman, C. Neuropeptide Y co-exist with vasoactive intestinal polypeptide and acetylcholine in parasympathetic cerebrovascular nerves originating in the sphenopalatine, optic and internal carotid ganglia of the rat. *Neuroscience*, 36(1990)507-519
- 71) Dahlof, C., Dahlof, P. and Lundberg, J. Alpha2-adrenoceptor-mediated inhibition of nerve stimulation-evoked release of neuropeptide Y(NPY)-like immunoreactivity in the pithed guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.*, 131(1986)279-283
- 72) Kaijser, L., Pernow, J., Berglund, B. and Lundberg, J. Neuropeptide Y is released together with noradrenaline from the human heart during exercise and hypoxia. *Clin. Physiol.*, 10(1990)179-188
- 73) Zukowska-Grojec, Z. and Vaz, A. Role of neuropeptide Y (NPY) in cardiovascular responses to stress. *Synapse*, 2(1988)293-298
- 74) Briand, R., Yamaguchi, N., Gagne, J., Nadeau, R. and deChamplain, J. alpha2-adrenoceptor modulation of catecholamine and neuropeptide Y in responses during haemorrhagic hypotension in anaesthetized dogs. *J. Auton. Nerv. Sys.*, 30(1990)111-122
- 75) Haass, M., Forster, C., Richardt, G., Lang, R. and Schomig, A. Role of calcium channels and protein kinaseC for release of norepinephrine and neuropeptide Y. *Am. J. Physiol.*, 259(1990) R925-R930
- 76) Edvinsson, L. Characterization of the contractile effect of neuropeptide Y in feline cerebral arteries. *Acta. Physiol. Scand.*, 125(1985)33-41

- 77) Lundberg, J., Franco-Cereceda, A., Lacroix, J. and Pernow, J. Neuropeptide Y and sympathetic neurotransmission. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 611(1990)166-174
- 78) Abel, P. and Han, C. Effects of neuropeptide Y on contraction relaxation and membrane potential of rabbit cerebral arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 13(1989)52-63
- 79) Westfall, T., Hans, S., Knuepfer, M., Martin, J., Chen, X., Del Valle, K., Ciarleglio, A. and Naes, L. Neuropeptides in hypertension: role of neuropeptide Y and calcitonin gene related peptide. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 30(1990)75S-82S
- 80) Aubert, J., Waeber, B., Rossier, B., Geering, K., Nussberger, J. and Brunner, H. Effects of neuropeptide Y on the blood pressure response to various vasoconstrictor agents. *J. Pharmacol. Exp. ther.*, 246(1988)1088-1092
- 81) Hieble, J., Duesler, J. and Daly, R. Effects of neuropeptide Y on the response of isolated blood vessels to norepinephrine and sympathetic field stimulation. *J. Pharmacol. Exp. ther.*, 250(1989)523-528
- 82) Andriantisitohaina, R., Andre, P. and Stoclet, J. Pertussis toxin abolishes the effect of neuropeptide Y on rat resistance arteriole contraction. *Am. J. Physiol.*, 259(1990)H1427-H1432
- 83) Lobaugh, L. and Blackshear, P. Neuropeptide Y stimulation of myosin light chain phosphorylation in cultured aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 265(1990)18393-18399

- 84) Lundberg, J., Pernow, J., Tatemoto, K. and Dahlof. Pre- and postjunctional effects of NPY on sympathetic control of rat femoral artery. *Acta. Physiol. Scand.*, 123(1985)511-513
- 85) Lundberg, J., Torssell, L., Sollevi, S., Pernow, J., Theodorsson-Norheim, E., Anggard, A. and Hamberger, B. Neuropeptide Y and sympathetic vascular control in man. *Regul. Pept.*, 13(1985)41-52
- 86) Wahlestedt, C., Yanaihara, N. and Hakanson, R. Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptide. *Regul. Pept.*, 13(1986)307-318
- 87) Varndell, I., Polak, J., Allen, J., Terenghi, G. and Bloom, S. Neuropeptide tyrosine(NPY) immunoreactivity in norepinephrine-containing cells and nerves of the mammalian adrenal gland. *Endocrinology*, 114(1984)1460-1462
- 88) Allen, J., Bircham, P., Bloom, S. and Edwards, A. Release of neuropeptide Y in response to splanchnic nerve stimulation in the conscious calf. *J. Physiol.*, 357(1984)401-408
- 89) Higuchi, H., Costa, E. and Yang, H. Neuropeptide Y inhibits the nicotine-mediated release of catecholamines from bovine adrenal chromaffin cells. *J. Pharmac. Exp. ther.*, 244(1988)468-474
- 90) Wahlestedt, C., Regunathan, S. and Reis, D. Identification of cultured cells selectively expressing Y1-, Y2-, or Y3-type receptors for neuropeptide Y/peptide YY. *Life Sci.*, 50(1992)PL7-PL12
- 91) Michel, M. Receptors for neuropeptide Y: multiple

- subtypes and multiple second messengers. Trends Pharmacol. Sci., 12(1991)389-394
- 92) Gordon, E., Kohout, T. and Fishman, P. Characterization of functional neuropeptide Y receptors in a human neuroblastoma cell line. J. Neurochem., 55(1990)506-513
- 93) Sheikh, S., O'Hare, M., Tortora, O. and Schwarz, T. Binding of monoiodinated neuropeptide Y to hippocampal membranes and human neuroblastoma cell lines. J. Biol. Chem., 264(1989)6648-6654
- 94) Wahlestedt, C., Grundemar, L., Hakanson, R., Heilig, M., Shen, G., Zukowska-Grojec, Z. and Reis, D. Neuropeptide Y receptor subtypes, Y1 and Y2. Ann. N. Y. Acad. Sci., 611(1990)7-26
- 95) Sheikh, S. and Williams, J. Structural characterization of Y1 and Y2 receptors for neuropeptide Y and peptide YY by affinity cross-linking. J. Biol. Chem., 265(1990)8304-8310
- 96) Balasubramaniam, A., Sheriff, S., Rigel, D. and Fisher, J. Characterization of neuropeptide Y binding sites in rat cardiac ventricular membranes. Peptides, 11(1990)545-550
- 97) Michel, M. and Buschauer, A. Neuropeptide Y and its antagonists. Drugs of the future. 17(1992)39-45
- 98) Fuhlendorff, J., Gether, U., Aakerlund, L., Langeland-Johansen, N., Thøgersen, H., Melberg, S., Olsen, U., Thastrup, O. and Schwartz, T. [Leu31, Pro34]Neuropeptide Y: a specific Y1 receptor agonist. Proc. Acad. Sci. USA., 87(1990)182-186
- 99) Krestenansky, J., Owen, T., Payne, M., Shatzner, S. and Buck, S. C-terminal modification of neuropeptide Y and

- its analogs leading to selectivity for the mouse brain receptor over the porcine spleen receptor. Neuropeptides, 17(1990)117-120
- 100) McLean, L., Buck, S. and Krestenansky, J. Examination of the role of the amphipathic alpha-helix in the interaction of neuropeptide Y and active cyclic analogues with cell membrane receptors and dimyristoylphosphatidylcholine. Biochemistry, 29(1990)2016-2022
- 101) Doughty, M., Chu, S., Miller, D. and Tessell, R. Benextramine: a long-lasting neuropeptide Y receptor antagonist. Eur. J. Pharmacol., 185(1990)113-114
- 102) Li, W., MacDonald, R. and Hexum, T. Role of sulfhydryl groups in Y2 neuropeptide Y receptor binding activity. J. Biol. Chem., 267(1992)7570-7575
- 103) Michel, M. and Motulsky, H. He90481: a competitive nonpeptidergic antagonist at neuropeptide Y receptors. Ann. NY. Acad. Sci., 611(1990)392-394
- 104) Edvinsson, L., Adamsson, M. and Jansen, I. Neuropeptide Y antagonistic properties of D-myo-inositol 1,2,6-triphosphate in guinea pig basilar arteries. Neuropeptides, 19(1990)13-16
- 105) Heilig, M., Edvinsson, L. and Wahlestedt, C. Effects of intracerebroventricular D-myo-inositol 1,2,6-triphosphate (PP56), a proposed neuropeptide Y(NPY) antagonist, on locomotor activity, food intake, central effects of NPY and NPY-receptor binding. Eur. J. Pharmacol., 209(1991)27-32
- 106) Tatemoto, K., Mann, M. and Shimizu, M. Synthesis of receptor antagonists of neuropeptide Y. Proc. Natl. Acad.

- . Sci. USA., 89(1992)1174-1178
- 107) Balasubramaniam, A. and Sheriff, S.
Neuropeptide Y(18-36) is a competitive antagonist of
neuropeptide Y in rat cardiac ventricular membranes. J.
Biol. Chem., 265(1990)14724-14727
- 108) Unden, A. and Bartfai, T. Regulation of neuropeptide Y
binding by guanine nucleotides in the rat cerebral
cortex. FEBS. Lett., 177(1984)125-128
- 109) Reynolds, E. and Yokota, S. Neuropeptide Y receptor-
effector coupling mechanisms in cultured vascular smooth
muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 151(1988)
919-925
- 110) Colmers, W., Klapstein, G., Fournier, A., St-Pierre, S.
and Treherne, K. Presynaptic inhibition by
neuropeptide Y in rat hippocampal slice in-vitro is
mediated by a Y2 receptor. Br. J. Pharmacol., 102(1991)
41-44
- 111) Ewald, D., Sternweis, P. and Miller, R. Guanine
nucleotide-binding protein Go-induced coupling of
neuropeptide Y receptors to Ca^{2+} channels in sensory
neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 85(1988)3633-3637
- 112) Hirning, L., Fox, A. and Miller, R. Inhibition of
calcium currents in cultured myenteric neurons by
neuropeptide Y: evidence for direct receptor/channel
coupling. Brain Res., 532(1990)120-130

第1章

ブタ中膜平滑筋でのNPY受容体結合部位の解析

先に述べた様に、NPYは末梢神経では交感神経系に存在し、神経伝達物質あるいは神経修飾物質として、NEと協同で血管系を制御している⁽¹⁻⁵⁾。NPYは直接血管に対して収縮作用があるだけでなく、交感神経刺激時や、NEを外から投与した時の収縮を増強させる働きがある。心臓では、冠動脈の内特に細冠動脈を収縮させ、心筋虚血を起こすことがわかっている⁽⁶⁾。またクモ膜下出血後、NPYの脳脊髄液中の濃度が上昇することから、NPYはクモ膜下出血後の脳血管収縮に深く関与していることが示唆されている⁽⁷⁾。このように血管制御系でNPYは重要な役割を果たしているという証拠が集まっているにもかかわらず、NPYの血管系での結合部位の解析を行った例はほとんどない。唯一の例外はウサギの大動脈の場合であるが、この時は神経部位を含んだ血管層を使っているため、厳密な意味での血管とは言にくい⁽⁸⁾。そこで中膜の純粋な平滑筋を使い、NPYの結合部位の解析を行うことにした。同時に、NPYの受容体のうち別のサブタイプであるY2が存在している海馬のNPY結合部位と比較検討した。

方法

(1) 試薬

ブタNPY(P-NPY)はペプチド研から購入した。ヒトNPY(H-NPY), PYY, トリPP(APP), ヒトPP(HPP), ラットPP(RPP)はペニンシュラ社

のものを使用した。 ^{125}I -Bolton-Hunter(^{125}I -BH)P-NPYはニューイングランドニュークリアー社から購入した。ATP, GMP, GDP, GTP, グアノシン5'-0-(3-チオトリフォスフェイト)
[guanosine 5'-0-(3-thiotriphosphate) (GTP- γ -S)],
5'-グアニリルイミドジフォスフェイト
(5'-guanylylimidodiphosphate [Gpp(NH)p]), NEはシグマ社のものを使用した。NPYのC末端フラグメントであるNPY(13-36)とNPY(24-36)は、ペプチド合成機で合成し、HPLCで精製した。ニソルジピン(nisordipine), ベラパミル(verapamil), ジルチアゼム(diltiazem)は当研究所で合成されたものを使用した。

(2) ブタ胸部大動脈平滑筋膜画分と海馬膜画分の調製

ブタ大動脈と脳は京都第一食肉センターから購入し、氷冷した生理食塩水に入れて実験室まで運搬した。大動脈は内膜と外膜を除き中膜を単離し細断後、5倍容量の50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に入れ、ブリンクマンボリトンホモジナイザーで10秒ずつ、5回ホモジナイズした。ホモジネートを2回ガーゼで濾過した後、10,000g, 10分間遠心した。上清をさらに100,000g, 20分遠心し、沈澱を5 $\mu\text{g/ml}$ アプロチニン, 1mM ジチオスレイトール, 1mMEDTA, 10% (v/v) グリセロールを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)(緩衝液A)に懸濁した。海馬膜画分は以下のように調製した。ブタ脳から海馬を取り出し、5mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4), 0.25M ショ糖を加えてガラステフロンホモジナイザーで破碎した。1000g, 10分遠心し、さらに100,000g, 20分間遠心して沈澱を緩衝液Aに懸濁した。

(3) 受容体結合実験

結合実験は、海馬膜画分10 μg と血管平滑筋膜画分50 μg を用い、37°Cで30分間行った。反応液には5mMの CaCl_2 , 0.1nM ^{125}I -BH-NPY,

0.2% ウシ血清アルブミンを加えた。結合反応は、氷冷した緩衝液Aを2.5ml反応液に加えて止め、直ちにワットマンGF/Cフィルターで濾過し、2.5ml 緩衝液Aで5回洗浄後、フィルター上の放射能を γ カウンターで測定した。ワットマンGF/Cフィルターはあらかじめ1%ポリエチレンイミンに浸して、フィルターの電荷を除いておいた。非特異的な結合を測定する時は、1 μM のNPY存在下で結合実験を行った。

(4) タンパク質定量

タンパク質濃度は、バイオラドのタンパク質定量キットを用い、Bradford法に従って行った⁽⁹⁾。

結果

(1) ^{125}I -BH-NPY結合部位の2価カチオン依存性

結合実験の最適条件を検討するため、各種カチオンの影響を調べた。2価カチオンを除いて、ブタ平滑筋膜画分と ^{125}I -BH-NPYを反応させると、非常に少ないが特異的なNPYの結合部位が検出された。その時の非特異的結合は、全結合部位の約80%であった。そこでNPYの結合部位の1価と2価カチオン特異性を、平滑筋膜画分と海馬膜画分を用いて調べた(図1)。

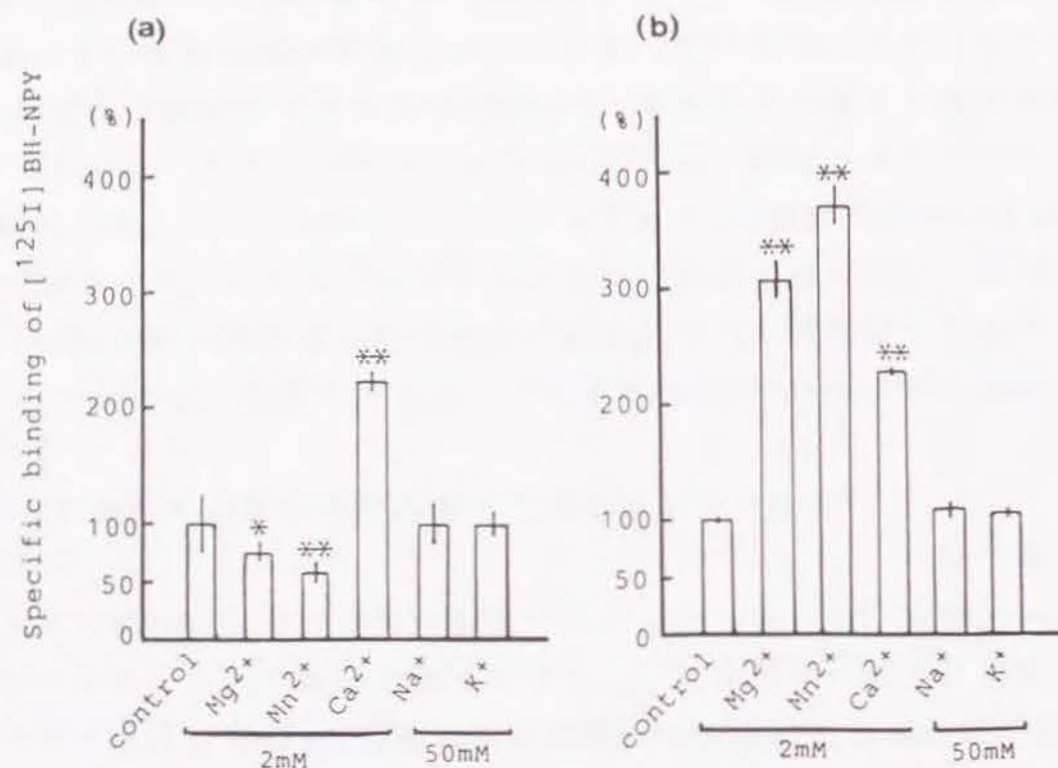


図1。ブタ平滑筋膜画分(a)と海馬膜画分(b)に存在するNPY結合部位に対する、1価カチオンと2価カチオンの影響。各値は平均値±SEM

*P<0.05, **P<0.001

図1 aに示す様に、血管平滑筋上のNPY結合活性は、 Ca^{2+} を添加した時のみに増加した。 Ca^{2+} の添加効果は5mMの時最大となり、非添加時の結合活性の約3.4倍にもなった。さらに添加量を増やすと、結合活性は逆に減少した。 Mn^{2+} の場合 Ca^{2+} とは異なり、結合活性は減少した。 Mg^{2+} や Na^+ 、 K^+ などの1価カチオンは影響を及ぼさなかった。一方海馬の場合平滑筋とは異なり、 Ca^{2+} ばかりでなく、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+} のどの2価カチオンでも結合活性は増大した(図1 b)。 Na^+ や K^+ などの1価カチオンは平滑筋の場合と同じく結合活性には影響を及ぼさなかった。NPYは各種血管に対し、NEの収縮作用を増強する効果があり、その作用はL型電位依存性カルシウムチャンネル(VDCC)阻害剤で消失することが知られている⁽³⁾。そこでNEとL型VDCCの阻害剤であるニソルジピンとジルチアゼムのNPY結合活性に及ぼす影響を調べたが平滑筋と海馬のいずれのNPY結合活性にも影響を与えなかった。

(2) ^{125}I -BH-NPY結合平衡

さらに結合実験の条件検討のために、反応タンパク質量と反応時間の検討を行った。 ^{125}I -BH-NPYの平滑筋膜への結合は、膜タンパク質量が10-100 μg /チューブの間では、タンパク質量に応じて直線的に増大した。また ^{125}I -BH-NPYの結合は20分間で平衡に達し、少なくとも2時間は安定であった。そこでNPYの平滑筋への結合活性を測定する時は、タンパク質量はチューブあたり50 μg 、反応時間は30分、温度は37°Cとした。図2 a, bに示すように、平滑筋のNPYの結合活性は、全結合活性の30%と少なかったが、海馬の場合は、70%であった。そこで両者のNPYの結合部位についてScatchard解析を行った

(図2 c, d)。平滑筋の場合、 K_d 値 $0.99 \pm 0.11 \text{ nM}$ 、 B_{max} は $0.35 \pm 0.06 \text{ pmol/mg-タンパク質}$ であった。海馬の場合は K_d 値は $0.40 \pm 0.17 \text{ nM}$ であり平滑筋の約2倍程度親和力が強かった。また B_{max} は $1.30 \pm 0.11 \text{ pmol/mg-タンパク質}$ で平滑筋の約3.5倍程度であった。

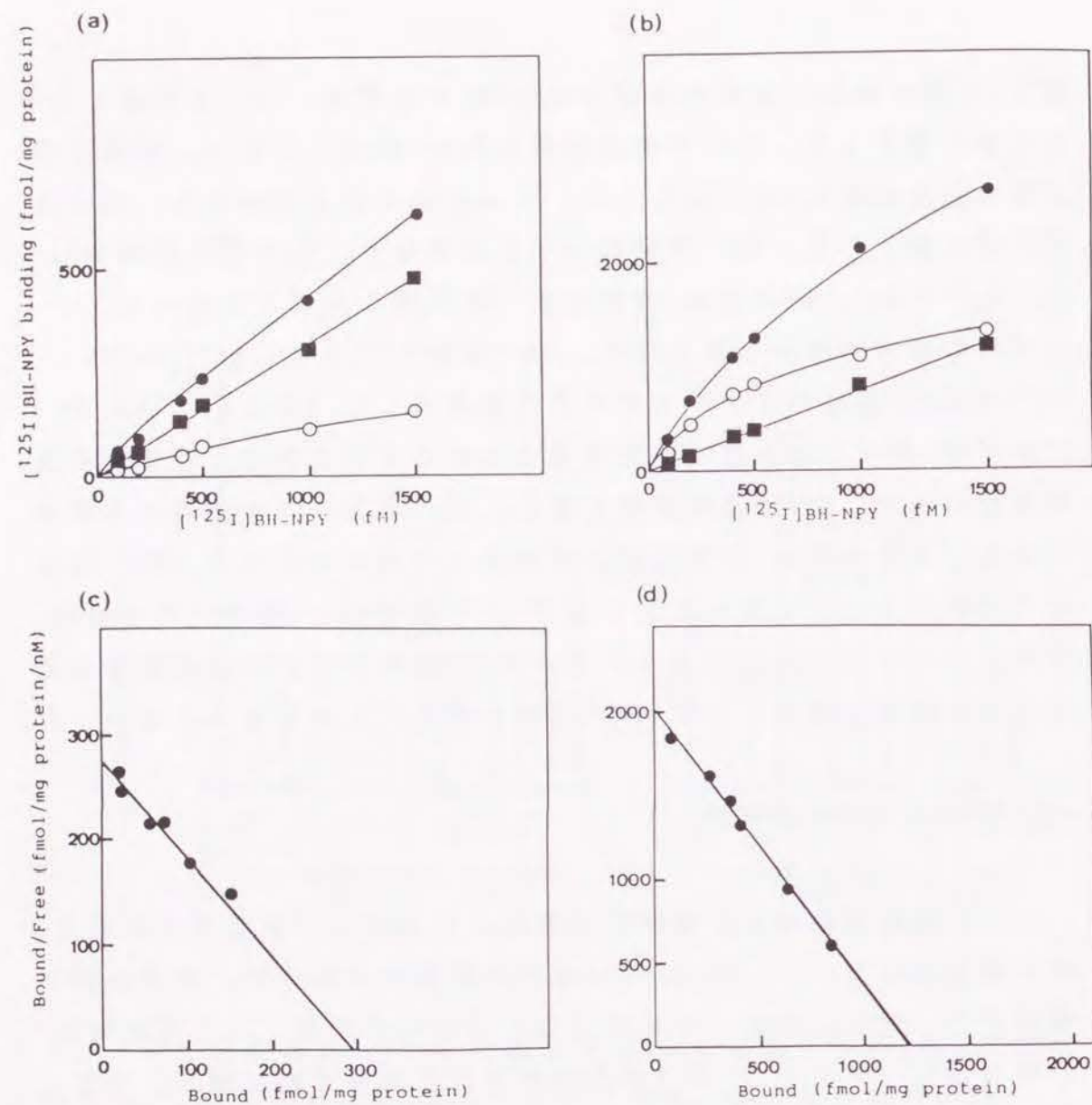


図2。ブタ平滑筋膜画分(a)と海馬膜画分(b)に対する、 $[^{125}\text{I}]\text{BH-NPY}$ の結合反応。(●)全体の結合量,(■)非特異的結合量,(○)特異的結合量。ブタ平滑筋膜画分(c)と海馬膜画分(d)に存在するNPY結合部位のScatchard解析

(3) ^{125}I -BH-NPY結合部位へのGTPアナログの影響

一般にNPY受容体はGTP結合タンパク質とリンクしていることが知られている。そこでGTPの非水解アナログであるGTP- γ -SとGpp(NH)pを用いて結合実験を行い、実際平滑筋上のNPY受容体にGTP結合タンパク質がリンクしているかを調べた。図3aに示す様に、GTP- γ -SとGpp(NH)pは濃度依存的に平滑筋のNPY結合活性を阻害した。GTPとGDPも濃度依存的に阻害したが、その程度はGTP非水解アナログに比べて約1/10に過ぎなかった。GMPとATPは1mMの濃度でもNPYの結合に対して阻害効果を示さなかった。一方海馬の場合、Gpp(NH)p以外の全てのGTPアナログは、平滑筋の場合よりも阻害作用は約10倍程度強かった(図3b)。

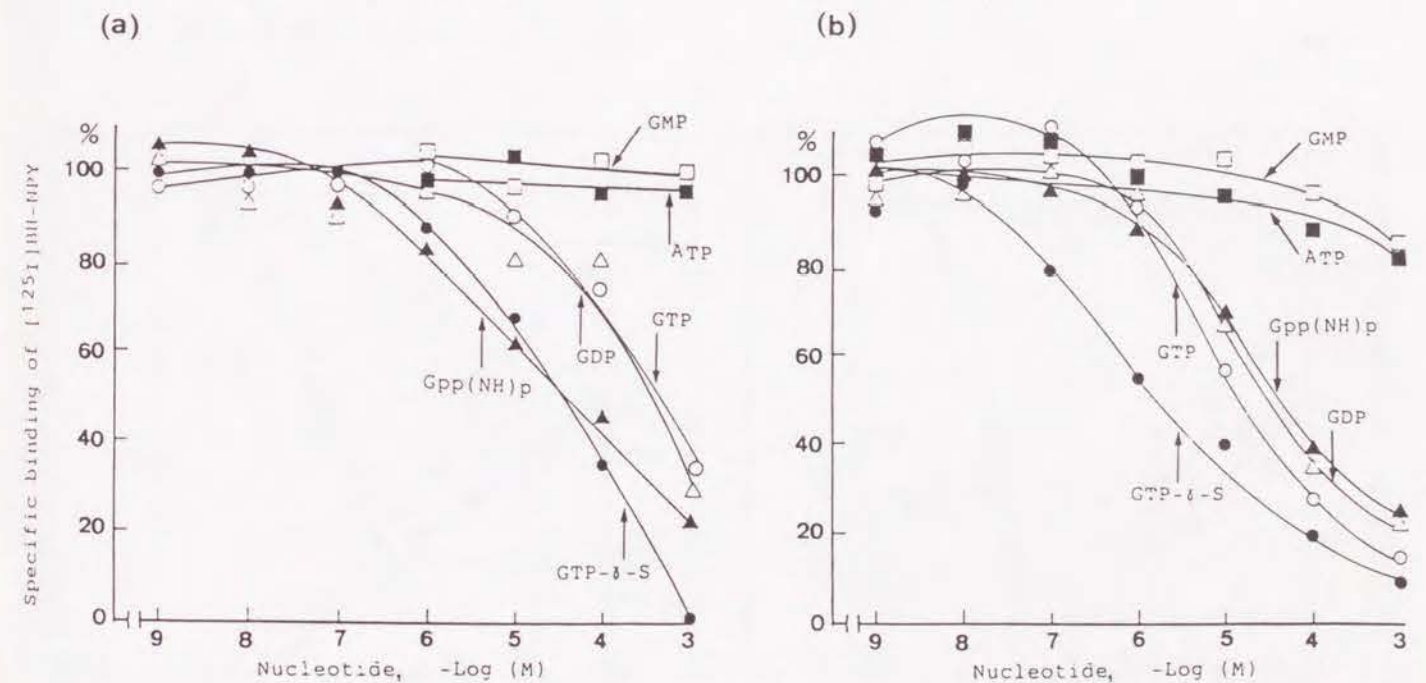


図3。ブタ平滑筋膜画分(a)と海馬膜画分(b)に存在するNPY結合部位に対する、ヌクレオチドの影響。(■)ATP;(□)GMP;(△)GDP;(○)GTP;(●)GTP- γ -S;(▲)Gpp(NH)p

次に、GTP- γ -Sによる結合阻害作用が、結合部位の減少によるのか、あるいは結合親和力の低下によるのかを調べるために、GTP- γ -S存在下と非存在下で、平滑筋と海馬の膜画分を用いてNPYの結合部位についてScatchard解析を行った(図4a,b)。平滑筋の場合、GTP- γ -S存在下でのKd値は2.15nMで、非存在下では0.99nMであった。BmaxはGTP- γ -S存在下で0.57pmol/mg-タンパク質、非存在下では0.46pmol/mg-タンパク質であった。同様の結果は海馬の膜画分を用いた時にも得られ、GTP- γ -S存在下でのKd値は1.08nMで、非存在下では0.40nMであり、BmaxはGTP- γ -S存在下で1.31pmol/mg-タンパク質、非存在下では1.23pmol/mg-タンパク質であった。つまり、GTP- γ -Sによって、平滑筋と海馬いずれもNPYの結合部位数は変わらなかったが、親和力は低下した。

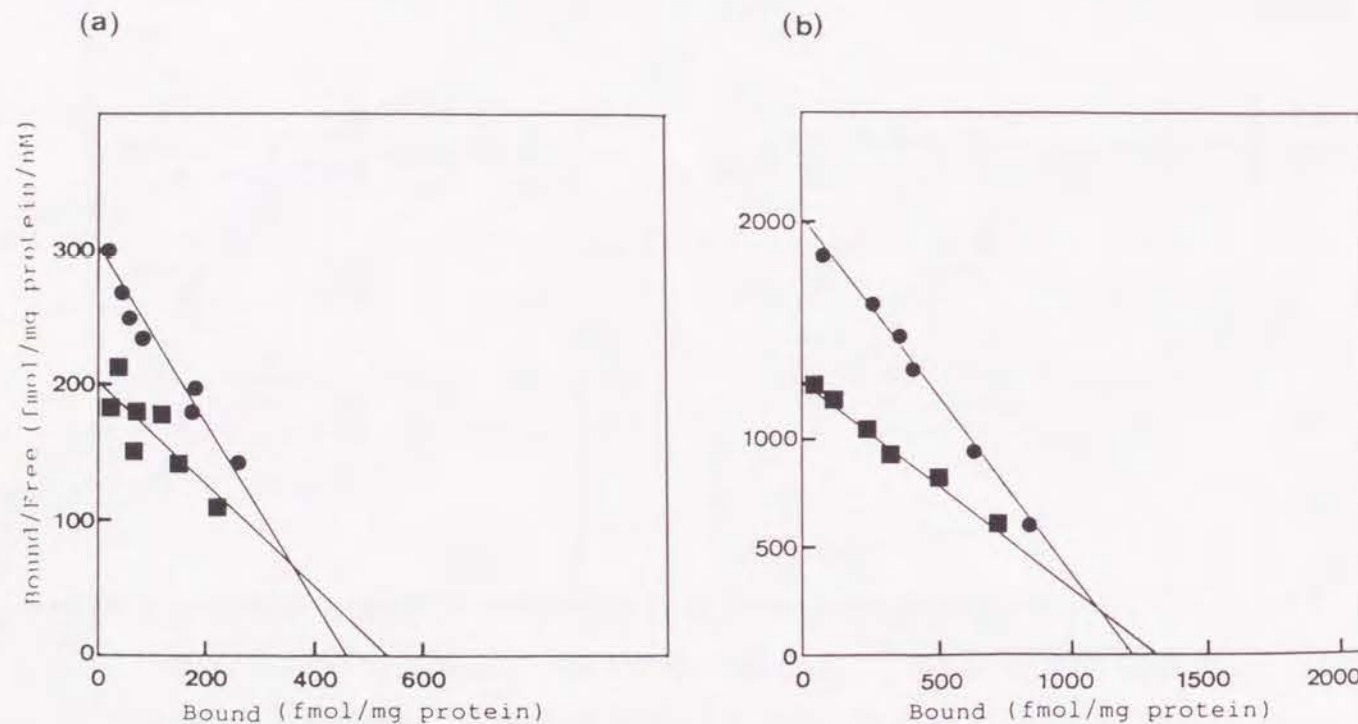


図4。GTP- γ -S存在下での、ブタ平滑筋膜画分(a)と海馬膜画分(b)に存在するNPY結合部位のScatchard解析。(■)GTP- γ -S存在時；(●)GTP- γ -S非存在時

(4) NPY関連ペプチドの 125 I-BH-NPY結合部位への影響

NPYはPYYとPPとファミリーを作っている。そこで、平滑筋と海馬膜画分上の 125 I-BH-NPY結合部位に及ぼす、これらのNPY関連ペプチドの影響を調べた(図5)。平滑筋では、ヒトNPY(H-NPY)、ブタNPY(P-NPY)、PYYの 125 I-BH-NPY結合部位へのIC50値はそれぞれ、 1.8 ± 0.2 nM, 1.5 ± 0.2 nM, 1.6 ± 0.3 nMであった。トリPP(APP), ヒトPP(HPP), ラットPP(RPP)はそれぞれH-NPY, P-NPY, PYYよりも親和力は弱く1/100以下であり、IC50値はそれぞれ、 380 ± 100 nM, 130 ± 30 nM, 230 ± 50 nMであった。一方海馬の場合、H-NPY, P-NPY, PYYはそれぞれ平滑筋よりも親和力は2倍程度強かった。またAPP, HPP, RPPなどのPPファミリーは 1μ Mの濃度でも 125 I-BH-NPY結合を阻害しなかった。

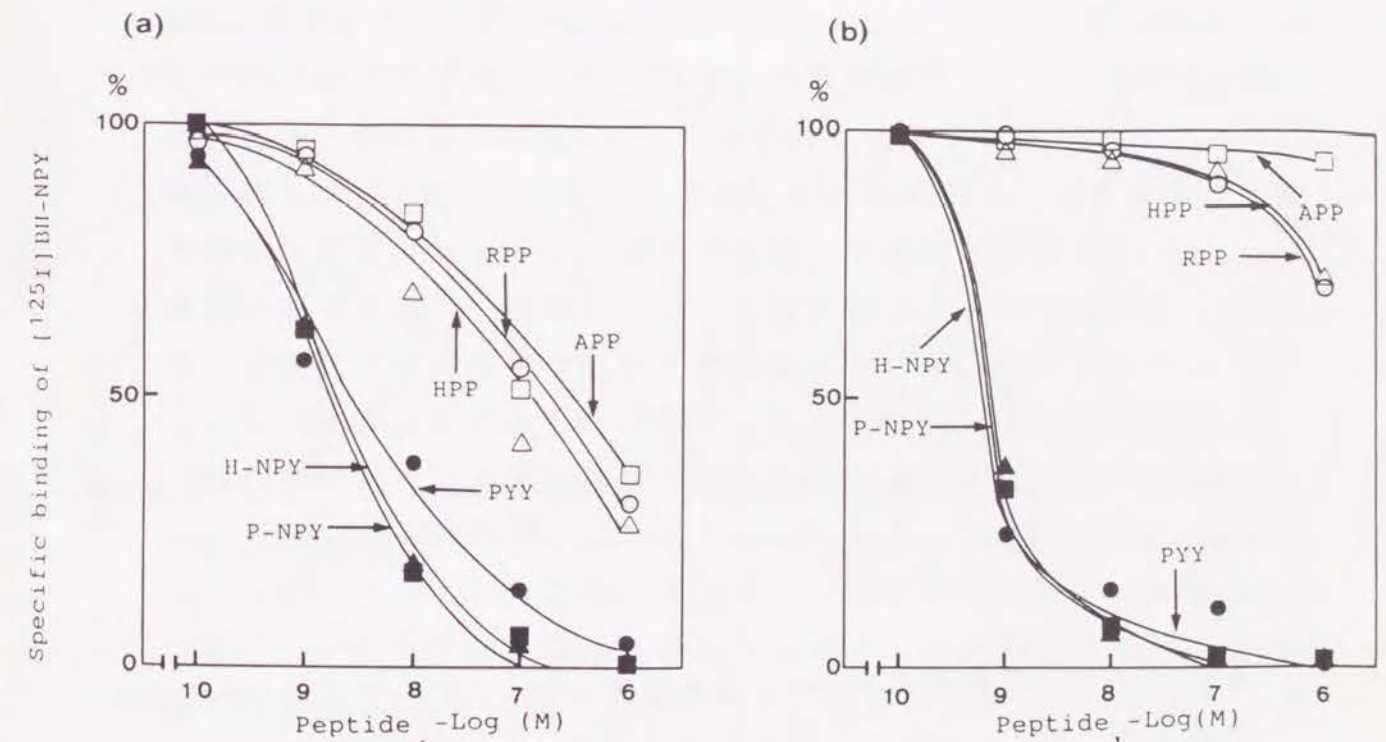


図5。ブタ平滑筋膜画分(a)と海馬膜画分(b)に存在するNPY結合部位に対する、NPY関連ペプチドの作用。(■)P-NPY；(●)PYY；(▲)H-NPY；(□)APP；(△)APP；(○)RPP

(5) NPYのC末端フラグメントの ^{125}I -BH-NPY結合部位への影響

一般に、NPYのC末端フラグメントであるNPY(13-36)とNPY(25-36)を用いてその親和力の差から、プレシナプスに存在すると言われているY2受容体とポストシナプスに存在するY1受容体は区別されている⁽¹⁰⁾。そこで平滑筋と海馬のNPY結合部位に対するこれら二つのC末端フラグメントの親和力を比較した。平滑筋の場合NPY(13-36)はNPYに比べて約1/30の親和力しか示さなかったが(図6a)、海馬では両者に差は無かった。1 μM のNPY(25-36)は平滑筋で40%、海馬で90% NPYの結合を阻害した。

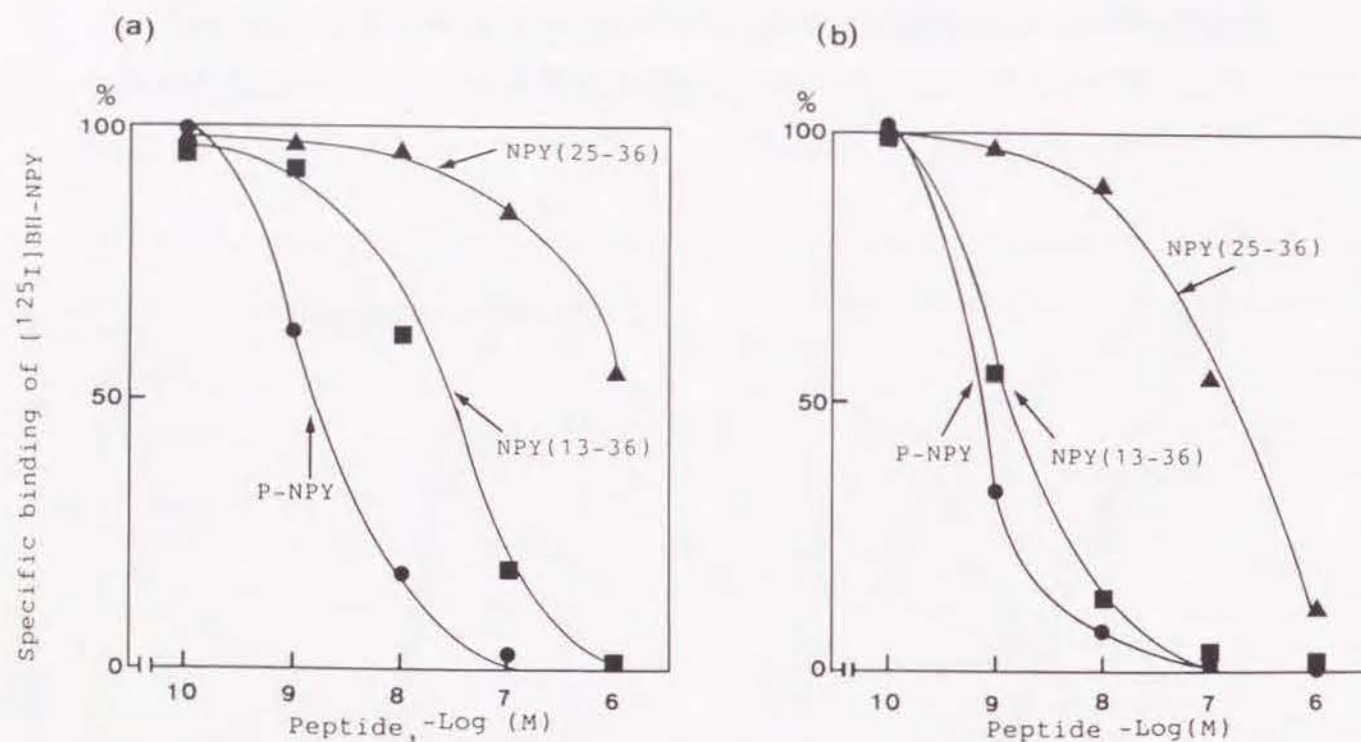


図6. ブタ平滑筋膜画分(a)と海馬膜画分(b)に存在するNPY結合部位に対する、NPY C末端フラグメントの作用。(■)NPY(13-36); (●)P-NPY; (▲)NPY(25-36)

考察

NPYの結合部位の解析はこれまで主に神経組織や培養細胞で行われてきた⁽¹¹⁻¹⁵⁾。末梢組織では、ウサギ血管^(8, 12), ウシ副腎髄質⁽¹⁶⁾, ブタ脾臓⁽¹⁷⁾, が用いられている。血管はNPYの重要なターゲット組織の一つであるにもかかわらず、NPYの結合部位の解析が行われているのはウサギ血管だけである^(8, 12)。しかしその場合血管組織全部についてNPYの結合部位の解析が行われているため、神経組織が含まれている可能性がある。そこでブタ胸部大動脈の純粋な中膜平滑筋を単離して、結合実験を行うことにした。平滑筋のホモジネートでは、NPYの結合は大部分非特異的であったが、ホモジネートの10,000gから100,000gの間の画分に特異的なNPY結合活性が存在した。5mMのカルシウムイオン添加で活性は最大となった。また結合はリガンド添加後直ちに起こり、20分後に平衡に達した。平滑筋の結合部位は海馬の結合部位の約1/4で、親和力は約半分であった。平滑筋と海馬膜画分についてScatchard解析を行ったところ、どちらも一種類の結合部位を持っていた。海馬の場合一種類の結合部位⁽¹³⁾と、二種類の結合部位⁽¹⁵⁾を持つという報告がある。今回の実験では一種類の結合部位のみを持つという結果になったが、これはアナログ置換実験や結合条件の違いによるのかもしれない。平滑筋における結合は Ca^{2+} により促進されたが、逆に Mn^{2+} によつては結合は抑制された。しかし Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} はこの順に海馬のNPY結合活性を高めた。 Ca^{2+} は Mg^{2+} による結合活性の増大を Ca^{2+} 添加時の値まで減少させた。つまり Ca^{2+} は Mg^{2+} よりも強い影響を及ぼすことがわかった。以前大脳皮質のNPY結合活性が、 Mg^{2+} や Ca^{2+} により増大することが報告されていたが⁽¹¹⁾、この場合二つのイオンの混合液で調べられており、単独効果をいままで見た例はなかった。本研究の海馬の場合と同様に、 Mn^{2+} と Mg^{2+} と Ca^{2+} がこの順で、ネズミ脳のNPY結合活性を増大するという報告はあるが⁽¹²⁾、平滑筋の場合は初めてである。 Ca^{2+} に

特異的なNPYの結合活性の増大が、平滑筋に特徴的であるのかどうかまださだかではない。GTPとGDP及びGTP- γ -SとGpp(NH)pは濃度依存的に 125 I-BH-NPYの結合活性を阻害した。しかし平滑筋の場合海馬に比べて感受性は1/10程度であった。GTP- γ -S存在下ではBmax値が変化しなかったが、Kd値は異なった値をとった。つまりGTPアナログの添加により、結合部位数はかわらずに、親和力が変化したことを示している。以上の結果から平滑筋及び海馬のNPY受容体はGTP結合タンパク質とリンクしていることが示唆された。Wahlestedtら⁽¹⁰⁾によると、NPYにはプレシナプスに存在するY2受容体と、ポストシナプスに存在するY1受容体の少なくとも二つのサブタイプからなっており、それらはNPYのC末端フラグメントの感受性が異なっていることが示唆されている。彼らの結果によると、ポストシナプスの作用であるNPYの血管収縮作用は、NPY(13-36)では起こらなかった。しかしプレシナプスを電気刺激した時の収縮はNPY(13-36)で有意に抑えられた。つまりNPYがプレシナプスのY2受容体を介して、電気刺激で放出されるNE量を減少させたためであると解釈され、Y2受容体はNPY(13-36)に対して高親和性であると考えられた。そこで平滑筋と海馬の膜画分を用いてNPYの結合部位の解析を行ったところ、平滑筋ではNPY(13-36)は低親和性、海馬では高親和性となり、平滑筋にはY1受容体、海馬にはY2受容体が存在することが示唆された。APP, HPP, RPPなどのPPファミリーは $1\mu\text{M}$ の濃度でも海馬のNPY結合部位を阻害しなかった。しかし平滑筋の場合 $1\mu\text{M}$ の濃度で約70%阻害した。

結論として、NPY(13-36)の感受性により、平滑筋上にはポストシナプス型のY1受容体が存在し、GTP結合タンパク質がリンクしていることが示唆された。また海馬のNPY結合部位とは、カチオン感受性、PPの親和性、GTPアナログの感受性などの点で異なっていることがわかった。

文献

- 1) Tatemoto, K., Carquist, M and Mutt, V. Neuropeptide Y-a novel brain peptide with structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature*, 296(1982) 659-660
- 2) Emson, P. and DeQuidt, M. NPY-a new member of the pancreatic polypeptide family. *Trends Neurosci.*, 11(1984) 31-35
- 3) Edvinsson, L., Hakanson, R., Wahlestedt, C. and Uddman, R. Effects of neuropeptide Y on the cardiovascular system. *Trends Pharmacol. Sci.*, 8(1987) 231-235
- 4) Lundberg, J. and Tatemoto, K. Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to alpha-adrenoceptor blockade. *Acta. Physiol. Scand.*, 116(1982)393-402
- 5) Lundberg, J., Trenius, L., Hokfelt, T., Martling, C., Tatemoto, K., Mutt, V., Polak, J., Bloom, S. and Goldstein, M. Neuropeptide Y(NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta. Physiol. Scand.*, 116(1982) 477-480
- 6) Maturi, M., Greene, R., Speir, E., Burrus, C., Dorsey, L., Markle, D., Maxwell, M., Schmidt, W., Goldstein, S. and Patterson, R. Neuropeptide Y, a peptide found in human coronary arteries, constricts primarily small coronary arteries to produce myocardial ischemia in dogs. *J. Clin. Invest.*, 83(1989)1217-1224

- 7) Abel, P., Han, C., Noe, B. and McDonald, J.
Neuropeptide Y: vasoconstrictor effects and possible role
in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid
hemorrhage. Brain Res., 463(1988)250-258
- 8) Chang, R., Lotti, V. and Chen, T. Specific
[³H]propionyl-neuropeptide Y(NPY) binding in rabbit aortic
membranes: comparisons with binding in rat brain and
biological responses in rat vas deferens. Biochem.
Biophys. Res. Commun., 151(1988)1213-1219
- 9) Bradford, M. A rapid and sensitive method for the
quantitation of microgram quantities of protein
utilizing the principle of protein-dye binding. Anal.
Biochem., 72(1976)248-254
- 10) Wahlestedt, C., Yanaihara, N. and Hakanson, R. Evidence
for different pre- and post-junctional receptors for
neuropeptide Y and related peptides. Regul. Pept., 13
(1986)307-318
- 11) Unden, A., Tatemoto, K., Mutt, V. and Bartfai, T.
Neuropeptide Y receptor in the rat brain. Eur. J.
Biochem., 145(1984)525-530
- 12) Chang, R., Lotti, V., Chen, T., Cernio, D. and Kling, P.
Neuropeptide Y(NPY) binding sites in rat brain labeled
with ¹²⁵I-Bolton-Hunter NPY: comparative potencies of
various polypeptides on brain NPY binding and biological
responses in rat vas deferens. Life Sci., 37(1985)
2111-2122
- 13) Busch-Sorensen, M., Sheikh, S., O'Hare, M., Tortora, O.,
Schwartz, T. and Gammeltoft, S. Regional distribution of
neuropeptide Y and its receptor in the porcine central
nervous system. J. Neurochem., 52(1989)1545-1552

- 14) Sheikh, S., Hakanson, R. and Schwartz, T. Y1 and Y2
receptors for neuropeptide Y. FEBS lett., 245(1989)
209-214
- 15) Sheikh, S., O'Hare, M., Tortora, O. and Schwartz, T.
Binding of monoiodinated neuropeptide Y to hippocampal
membranes and human neuroblastoma cell lines. J. Biol.
Chem., 264(1989)6648-6654
- 16) Higuchi, H., Costa, E. and Yang, H. Neuropeptide Y
inhibits the nicotine-mediated release of catecholamines
from bovine adrenal chromaffin cells. J. Pharmacol. Exp.
Ther., 244(1988)468-474
- 17) Lundberg, J., Hemsén, A., Larsson, O., Rudehill, O.,
Saria, A. and Fredholm, B. Neuropeptide Y receptor in
pig spleen: binding characteristics, reduction of cyclic
AMP formation and calcium antagonist inhibition of
vasoconstriction. Eur. J. Pharmacol., 145(1988)21-29

第2章

平滑筋細胞でのNPY受容体を介する情報伝達系

NPYは交感神経系に分布しNEと共存していることが知られている⁽¹⁻²⁾。平滑筋は交感神経の支配を受け、NEとNPYにより制御されている組織の一つである⁽²⁻⁶⁾。前章では、ブタ血管平滑筋膜画分に、NPYの結合部位を確認した。そこで次に、培養平滑筋細胞での、受容体を介した、NPYの情報伝達系の解析を行うことにした。NPYの情報伝達系については、いくつかの神経細胞で報告されている⁽⁷⁻¹⁰⁾。シカゴ大学のMillerらは⁽⁹⁾、ラット知覚神経細胞ではNPYはイノシトール1, 4, 5, 三リン酸の産生を促進し、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすと報告している。一方平滑筋細胞においては、NPYはcAMPの産生を抑制し、それが引金となって血管収縮を起こると考えられていた⁽¹¹⁻¹²⁾。しかし血管収縮を考える上で、平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は不可欠である⁽¹³⁾。そこでNPYによる血管収縮に、平滑筋の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を伴うかどうか培養平滑筋細胞を用いて調べた。

方法

(1) 試薬

ブタNPY, ブラジキニン(bradykinin: BK), アンジオテンシンII(angiotensinII: AII)はペプチド研から購入した。

フラ-2-AM(Fura-2-AM)は同仁化学研究所の製品を使用した。

3-イソブチル-1-メチル-キサンチン

(3-Isobutyl-1-methyl-xanthine: IBMX)とフォルスコリン

(forskolin)はシグマ社から購入した。ニソルジピン, ペラパミルなどのL型カルシウムイオンチャンネルブロッカーは当研究所で合成された。

(2) 細胞培養

ブタ平滑筋細胞(porcine aortic smooth muscle cell)は、ブタ胸部大動脈中膜平滑筋層から、Rossらの方法に従って単離した⁽¹⁴⁾。細胞は199培地に10%ウシ胎児血清, 10mM HEPES(pH7.4), ストレプトマイシン, ペニシリンGを添加し、37°Cで5%CO₂を満たした培養器中で培養した。細胞密度が高くなれば植えつぎ、3-8代継代の細胞を実験に使用した。

(3) 細胞内 Ca^{2+} 濃度測定

細胞内 Ca^{2+} 濃度は、 Ca^{2+} 感受性の蛍光試薬であるフラ-2-AMを用いて測定した。細胞は75-cm²のプラスチック培養フラスコ中で細胞密度が高くなるまで培養し、0.05%トリプシン, 0.2%EDTAで37°Cで3分間処理して細胞をフラスコから剥した。細胞は培地で一度洗浄した後、細胞数を数え、最終的に 1×10^6 cells/mlの濃度になるようにHEPES(20mM)を含むハanks緩衝液(pH7.4)に懸濁した。次に2 μ Mのフラ-2-AMを加え37°Cで30分間インキュベーションを行った。フラ-2-AMを負荷した細胞は、HEPES(20mM)-ハanks緩衝液(pH7.4)で2回洗浄後、終濃度 5×10^6 cells/mlになるように懸濁し、測定用のキュベットに0.5mlずつ加えた。細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定は、日本分光のCAF-100を用いて行った。励起波長は340と380nm、放射波長は510nmを使用した。細胞内 Ca^{2+} 濃度($[Ca^{2+}]_i$)の測定は以下の式に従って計算した⁽¹⁵⁾。

$$[Ca^{2+}]_i = K(F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

この式では、 K はフラ-2の Ca^{2+} に対する親和力で、 K は224nM、 F は Ca^{2+} 濃度を知りたい時の蛍光強度、 F_{\min} と F_{\max} は最小と飽和した状態での細胞内 Ca^{2+} 濃度における蛍光強度である。 F_{\max} を測定するには、TritonX-100を加えて測定し、その後トリスとEGTAを入れて F_{\min} を測定した。

(4)cAMPの測定

199培地に10mMHEPES(pH7.4)を加えた溶液に、 1×10^6 cells/mlの濃度になるように細胞を懸濁した。その200 μ lを取り、0.1mM IBMX存在下と非存在下で、10分間37°Cでプレインキュベーションをした。その後、1 μ M NPY単独で、または10 μ M フォルスコリンを加えて細胞を刺激し、2分間反応させた。40 μ lの50%トリクロロ酢酸で反応を停止し、水飽和エーテルでトリクロロ酢酸を除去し、水溶液中のcAMP量をアマーシャム社のcAMP測定用キットで測定した。

(5)イノシトール1, 4, 5 三リン酸

(IP_3 : inositol 1, 4, 5-trisphosphate)の測定

IP_3 の測定はアマーシャム社のキットを用いて行った⁽¹⁶⁾。199培地に10mMHEPES(pH7.4)と10mM LiClを加えた溶液に、 5×10^6 cells/mlの濃度になるように細胞を懸濁し、その内500 μ lを取り、1 μ MのNPYまたはBKあるいはAII存在下、10分間37°Cで反応を行った。37 μ lの20%過塩素酸を加え反応を停止、14 μ lの水酸化カルシウムで中和後、 IP_3 測定キットを用いて上清中の IP_3 量を測定した。

結果

ブタ培養平滑筋細胞で、NPYは濃度依存的に細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた(図1a)。最大の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇をもたらすNPYの濃度は 10^{-7} Mであった。またNPYのEC50値は 3×10^{-9} Mであった。次にNPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が、細胞外からの流入によるのか、細胞内の Ca^{2+} のプールからの動員の結果であるのかを調べた(図1b)。細胞外に2mMのEGTAを添加して、細胞外のフリーの Ca^{2+} を除いても、NPYによる細胞内カルシウムイオンの上昇は明らかに認められた。またL型カルシウムチャンネル阻害剤であるニソルジピンは、NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇には影響を及ぼさなかった。従って細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、細胞内の Ca^{2+} の動員によると考えられた。NPYのほかにBKとAIIでも細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こした(図1c)。いずれの場合もそれぞれ同じアゴニストを2回続けて投与した時は、2回目には細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が認められず、ホモ脱感作が示唆された。BKで一度細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた後、AIIで刺激しても本来の作用よりも弱い細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇しか認められず、従ってヘテロ脱感作といえる。しかし、BKとNPYあるいはAIIとNPYの間ではヘテロ脱感作はほとんど認められなかった。図1dに示すように、NPYによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇はBKによるよりも小さく、上昇初速度もAIIやBKに比べて低かった。また一般にNPY受容体は百日咳毒素(PTX or islet activating protein: IAP)感受性のGTP結合タンパク質とリンクしていることが知られている。そこでNPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対するPTXの影響を調べた。PTXで3時間処理すると、NPYの作用は消失したが、AIIやBKなどの効果は影響を受けなかった。つまりNPY受容体はPTX感受性のGTP結合タンパク質とリンクしているが、AIIやBKの受容体はPTX非感受性のGTP結合タンパク質であるGqとカップルしていることが示唆された。

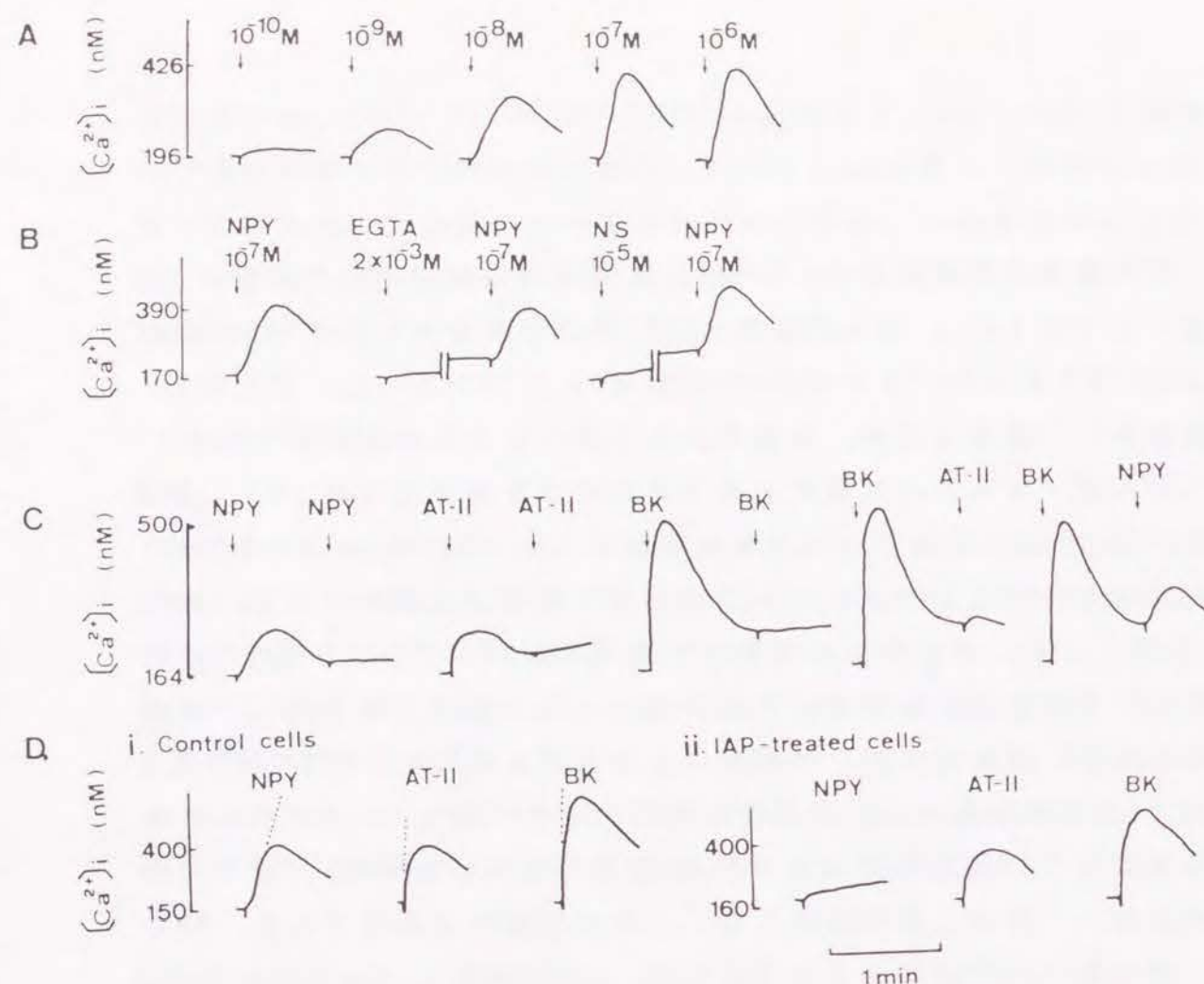


図1。NPY, AII, BKによる平滑筋細胞での細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用。

(A) NPY($10^{-10} M - 10^{-6} M$)による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇。

(B) EGTAとVDCCブロッカー、ニソルジピン(NS)の影響。

(C) NPY($10^{-7} M$), AII($10^{-6} M$), BK($10^{-6} M$)による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇:
:ホモ及びヘテロ脱感作について。

(D) PTX(pertussis toxin, islet activating protein:IAP)の効果。

PTX(100ng/ml)で3時間細胞を前処理後NPY($10^{-6} M$), AII($10^{-6} M$), BK($10^{-6} M$)を加えた。

IP₃はイノシトールリン脂質の分解物であり、細胞内の Ca^{2+} プールから細胞質内に Ca^{2+} を放出させる、いわゆるセカンドメッセンジャーと考えられている⁽¹⁷⁾。IP₃の分解を防ぐため10mM LiClを添加し、無刺激で10分間経過後のIP₃量は、 $3.90 \pm 0.98 \text{ pmol}/10^6 \text{ cell}$ であった。図2に示すように、BKとAIIを加えると、15秒間でそれぞれ無刺激時の320%と160%までIP₃量は増大した。BKとAIIのIP₃生成効果は、それぞれ細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇効果とよく一致していた。しかしNPYはIP₃生成には影響しなかった。従ってNPYによる Ca^{2+} 動員は、IP₃- Ca^{2+} にはよらないことが示唆された。次に細胞内のcAMP含量に及ぼすNPYの効果及び、cAMP含量がNPYによる細胞内 Ca^{2+} 動員に及ぼす影響を調べた。図3に示すように、NPYはフォスコリンによるcAMPの過剰生成を抑えた。このことはNPYがアデニル酸シクラーゼの調節になんらかの役割を果たしていることを示唆している。一方細胞をフォスコリンやIBMX(0.1mM)とプレインキュベーションして、細胞内のcAMP量を16倍に増やしても、NPYによる細胞内 Ca^{2+} 動員には影響は見られなかった。

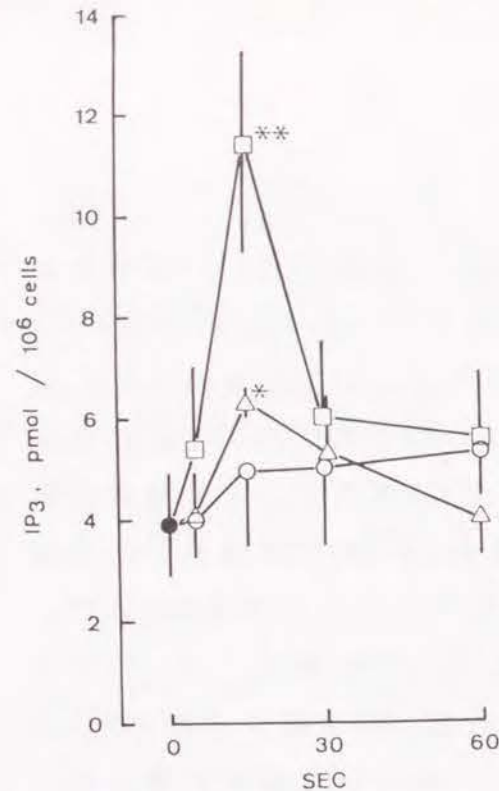


図2。NPY, AII, BKによるIP₃産生。
(○)NPY(10⁻⁶M);(△)AII(10⁻⁶M);(□)BK(10⁻⁶M)

*P<0.1, **P<0.01

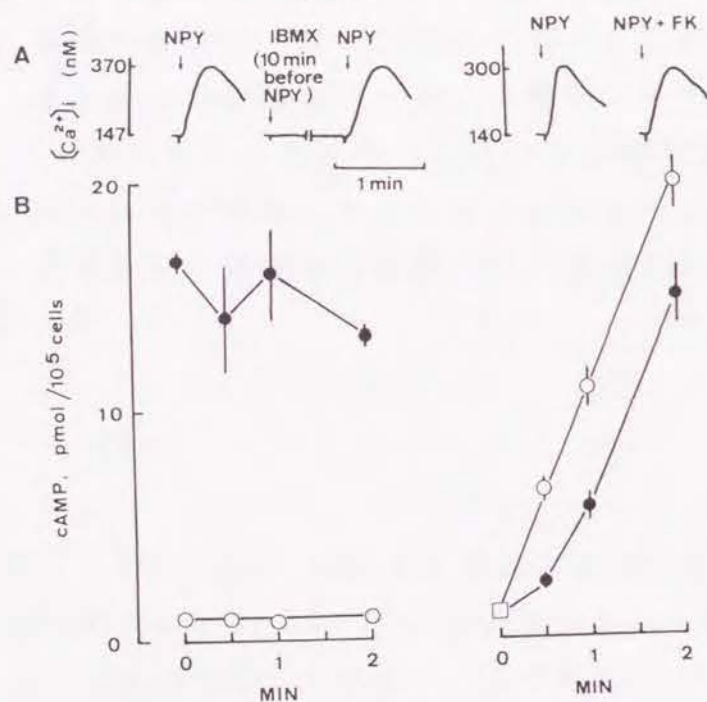


図3。NPYの細胞内Ca²⁺濃度上昇作用に対する、cAMPの効果。
(A)IBMX(0.1mM)とフォルスコリン(10μM)の影響。
IBMXはNPYを加える10分前に添加し、フォルスコリンはNPYと同時添加した。
(B)NPYのcAMP産生に対する効果。
(左)(○)control, NPY(10⁻⁶M)を単独で添加。
(●)IBMXを10分前に添加し、さらにNPY(10⁻⁶M)を加えた。
(右)(○)フォルスコリン(10μM)を単独で加えた。
(●)フォルスコリン(10μM)とNPY(10⁻⁶M)を加えた。

考察

Reynoldsらによるとウサギ肺動脈では、NPYは細胞内Ca²⁺濃度上昇は起こさなかった⁽¹²⁾。しかし本研究によればブタ培養平滑筋細胞では、NPYは濃度依存的かつ一過性に、細胞内Ca²⁺濃度上昇を起こした。平滑筋での細胞内Ca²⁺濃度上昇には二つの経路が考えられる。一つは細胞外からの流入で、一つは細胞内のプールからの流出である。NPYによる細胞内Ca²⁺濃度上昇は、細胞外にEGTAを添加し、細胞外のフリーなCa²⁺を除いても、あるいは電位依存性Ca²⁺チャンネルブロッカーを加えても、わずかしき影響を受けなかった。つまりNPYによる細胞内のCa²⁺の動員は、主に細胞内のCa²⁺プールからの流出によると考えられる。しかしわずかでもEGTAの影響が見られるのは、EGTAを添加することにより細胞内のCa²⁺のプールも一部減少するためかもしれない⁽¹⁸⁾。BKとAIIはNPYと同様に、細胞内プールからCa²⁺を動員して、細胞内Ca²⁺濃度の上昇を起こすが、いくつかの点でNPYの場合と異なっている。まず第一にBKやAIIに比べると、NPYの細胞内Ca²⁺濃度上昇は遅い。第二に細胞をPTX処理するとNPYの作用は消失するが、BKとAIIによる細胞内Ca²⁺濃度上昇は影響されない。第三にBKとAIIではヘテロ脱感作が起こるが、いずれもNPYとは起こさない。最後に、BKとAIIはIP₃の生成を促進するが、NPYはこのイノシトールリン脂質情報伝達系の亢進を起こさない。

以上の結果からNPYは受容体、PTX感受性GTP結合タンパク質を介して、細胞内Ca²⁺濃度上昇を起こすが、IP₃の蓄積、すなわちホスホリパーゼCの活性化を伴わないことが示唆された。一方BKとAIIはIP₃生成の亢進を引き起こし、よく知られたIP₃-Ca²⁺経路で細胞内Ca²⁺濃度上昇を起こすと考えられる⁽¹⁹⁻²⁰⁾。IBMXとフォルスコリンは細胞内のcAMP量を増大させるが、これらで細胞を処理をしてもNPYの効果は変化しなかったことから、細胞内cAMP量は、NPYの細胞内Ca²⁺濃度上昇には影響を及ぼさないと考えられる。つまりIBMXやフォルスコ

リンによるcAMP生成上昇に対するNPYの阻害効果は直接NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇には関係ないと考えられる。一般に細胞内の Ca^{2+} プールからの Ca^{2+} の放出は、 IP_3 の産生の結果起こることが知られている⁽¹⁷⁾。ラットの脊髄神経節細胞では、NPYがPTX感受性のGTP結合タンパク質と IP_3 産生を経由して、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を起こすことが報告されている⁽⁸⁻¹⁰⁾。平滑筋細胞でNPYが今回の測定感度では検出されない低能度の IP_3 産生を起こして、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させるという可能性は除外できない。しかしNPYと同程度の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇をもたらすAIIが、 IP_3 産生を起こすことから、AIIとは明らかに異なった作用機構でNPYは働いていると考えられる。NPYが IP_3 産生を伴わずに、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こすことは、Michelらもヒト赤芽白血病細胞で報告している⁽²¹⁾。現在の段階でNPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇がどのようなメカニズムで起こっているかよくわからないが、グルカゴンやインシュリンのように、細胞膜の Ca^{2+} 依存性のATPaseが影響しているのかもしれない⁽²²⁻²⁴⁾。

文献

- 1) Lundberg, J., Trenius, L., Hokfelt, T., Martling, C., Tatemoto, K., Mutt, V., Polak, J., Bloom, S. and Goldstein, M. Neuropeptide Y(NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function. *Acta. Physiol. Scand.*, 116(1982) 477-480
- 2) Edvinsson, L., Hakanson, R., Wahlestedt, C. and Uddman, R. Effects of neuropeptide Y on the cardiovascular system. *Trends Pharmacol. Sci.*, 8(1987) 231-235
- 3) Pernow, J., Saria, A. and Lundberg, J. Mechanisms underlying pre- and postjunctional effects of neuropeptide Y in sympathetic vascular control. *Acta. Physiol. Scand.*, 126(1986)239-249
- 4) Wahlestedt, C., Yanaihara, N. and Hakanson, R. Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul. Pept.*, 13 (1986)307-318
- 5) Oshita, M., Kigoshi, G. and Muramatsu, I. Selective potentiation of extracellular Ca^{2+} -dependent contraction by neuropeptide Y in rabbit mesenteric arteries. *Gen. Pharmacol.*, 20(1989)363-367
- 6) Dumont, Y., Martel, J., Fournier, A., St-Pierre, S. and Quirion, R. Neuropeptide Y and neuropeptide Y receptor subtypes in brain and peripheral tissues. *Prog. in Neurobiol.*, 38(1992)125-167
- 7) Ewald, D., Pang, I., Sternweis, P. and Miller, R.

- Different G protein-mediated coupling of neurotransmitter receptor to Ca^{2+} channels in rat dorsal root ganglion neurons in vitro. *Neuron*, 2(1989)1185-1193
- 8) Ewald, D., Sternweis, P. and Miller, R. Guanine nucleotide-binding protein Go-induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca^{2+} channels in sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85(1988)3633-3637
- 9) Perney, T. and Miller, R. Two different G-proteins mediate neuropeptide Y and bradykinin-stimulated phospholipid breakdown in cultured rat sensory neurons. *J. Biol. Chem.*, 264(1989)7317-7327
- 10) Olasmaa, M., Pahlman, S. and Terenius, L. Beta-adrenoceptor, vasoactive intestinal polypeptide(VIP) and neuropeptide tyrosine(NPY) receptors functionally coupled to adenylate cyclase in the human neuroblastoma SK-N-MC cell line. *Neurosci. lett.*, 83(1987)161-166
- 11) Fredholm, B., Jansen, I. and Edvinsson, L. Neuropeptide Y is a potent inhibitor of cyclic AMP accumulation in feline cerebral blood vessels. *Acta. Physiol. Scand.*, 124 (1985)467-469
- 12) Reynolds, E. and Yokota, S. Neuropeptide Y receptor-effector coupling mechanisms in cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151(1988)919-925
- 13) Bolton, T.B. *Physiol. Rev.*, 59(1979)606-718
- 14) Ross, R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J. Cell. Biol.*, 50(1971)172-186
- 15) Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 260(1985) 3440-3450
- 16) Fu, T., Okano, Y. and Nozawa, Y. Bradykinin-induced generation of inositol 1, 4, 5-trisphosphate in fibroblasts and neuroblastoma cells: effects of pertussis toxin, extracellular calcium, and down-regulation of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157(1988)1429-1435
- 17) Berridge, M. and Irvine, R. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*, 312(1984)315-321
- 18) Putney, J.W. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7(1986)1-12
- 19) Nabika, T., Velletri, P., Lovenberg, W. and Beaven, M. Increase in cytosolic calcium and phosphoinositide metabolism induced by angiotensinII and [Arg]vasopressin in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 260 (1985)4661-4670
- 20) Roe, M., Hepler, J., Harden, T. and Herman, B. Platelet-derived growth factor and angiotensinII cause increases in cytosolic free calcium by different mechanisms in vascular smooth muscle cells. *J. Cell. Physiol.*, 139(1989)100-108
- 21) Motulsky, H. and Michel, M. Neuropeptide Y mobilizes Ca^{2+} and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells. *Am. J. Physiol.*, 255(1988)E880-885
- 22) Mallat, A., Pavoine, C., Dufour, M., Lotersztajn, S., Bataille, D. and Pecker, F. A glucagon fragment is responsible for the inhibition of the liver Ca^{2+} pump by glucagon. *Nature*, 325(1987)620-622

- 23) Pershadsingh, H. and McDonald, J. Direct addition of insulin inhibits a high affinity Ca^{2+} -ATPase in isolated adipocyte plasma membranes. *Nature*, 281(1979)495-497
- 24) Soloff, M. and Sweet, P. Oxytocin inhibition of (Ca^{2+} + Mg^{2+})-ATPase activity in rat myometrial plasma membranes. *J. Biol. Chem.*, 257(1982)10687-10693

第3章

培養ブタ平滑筋細胞でのNPY受容体の結合部位の解析とNPYによる細胞内カルシウムイオン濃度上昇の解析

薬理学的結果から、NPYには少なくともY1とY2と言われる2種類の受容体があることがわかっている⁽¹⁻³⁾。NPYのC末端フラグメントの一つであるNPY(13-36)はY2受容体の、[Leu31, Pro34]NPYはY1受容体の特異的アゴニストである⁽³⁾。前章で、培養平滑筋細胞において、NPYがPTX感受性GTP結合タンパク質を経由し、 IP_3 産生を起こさず、細胞内の Ca^{2+} プールから Ca^{2+} を放出させ、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を起こすことを報告した。次に培養平滑筋細胞に機能的なNPYの結合部位が存在するかどうか調べ、その受容体はいずれのタイプであるかを解析し、その受容体の活性化により細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が実際に起こるのかを調べた。

方法

(1) 試薬

P-NPYはペプチド研から購入した。PYY, APP, HPP, RPPはペニンシユラ社から購入した。NPY(13-36)とNPY(25-36)はペプチド合成機で合成後HPLCで精製して使用した。

(2) 細胞培養

ブタ平滑筋細胞の培養は、第2章に記した方法で行った。

(3) 結合実験

ブタ平滑筋細胞は75-cm²のプラスチック培養フラスコ中で細胞密度が高くなるまで培養し、0.2%EDTA存在下、37°C, 3分間、0.05%トリプシンで処理して細胞を剥した。細胞は50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)に5μg/ml アプロチニン, 1mM ジチオスレイトールを加えた緩衝液(緩衝液A)で2回洗浄し、凍結融解を2回繰り返し、ポリトロホンホジナイザーで破碎した。破碎液は1000gで10分間遠心し、上清をさらに100,000gで20分間遠心し、沈澱を緩衝液Aで一度洗浄し、10%(v/v)グリセロールを加えた緩衝液Aに懸濁し、-80度で保存した。結合実験は、このように調製した細胞膜画分18μgを使い、2mM CaCl₂, 0.1nM [¹²⁵I]-BH-NPY, 0.2% ウシ血清アルブミンを加えて37°C, 30分間行なった。氷冷した50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)の2.5mlを反応液に加えて結合反応を停止し、すぐにワットマンGF/Cフィルターで濾過し、2.5mlの氷冷した50mM トリス塩酸緩衝液(pH7.4)で5回洗浄した。そしてフィルター上の放射能をγカウンターで測定した。ワットマンGF/Cフィルターはあらかじめ1%ポリエチレンイミンに浸してあった。非特異的な結合を測定する時は、1μMのNPY存在下で結合反応を行なった。

(4) 細胞内Ca²⁺濃度測定

細胞内Ca²⁺濃度は、Ca²⁺感受性の蛍光試薬であるフラ-2-AMを用いて、第2章に記したように測定した。

結果

まず30分間、37°Cで結合実験を行うと、ブタ培養平滑筋細胞膜画分にNPY結合活性が見いだされた。図1左に示すように全体の結合量、非特異的結合量、特異的結合量が得られた。Scatchard解析を行うとKd値は1.1±0.2nM, Bmaxは0.68±0.10 pmol/mg-タンパク質であった(図1右)。

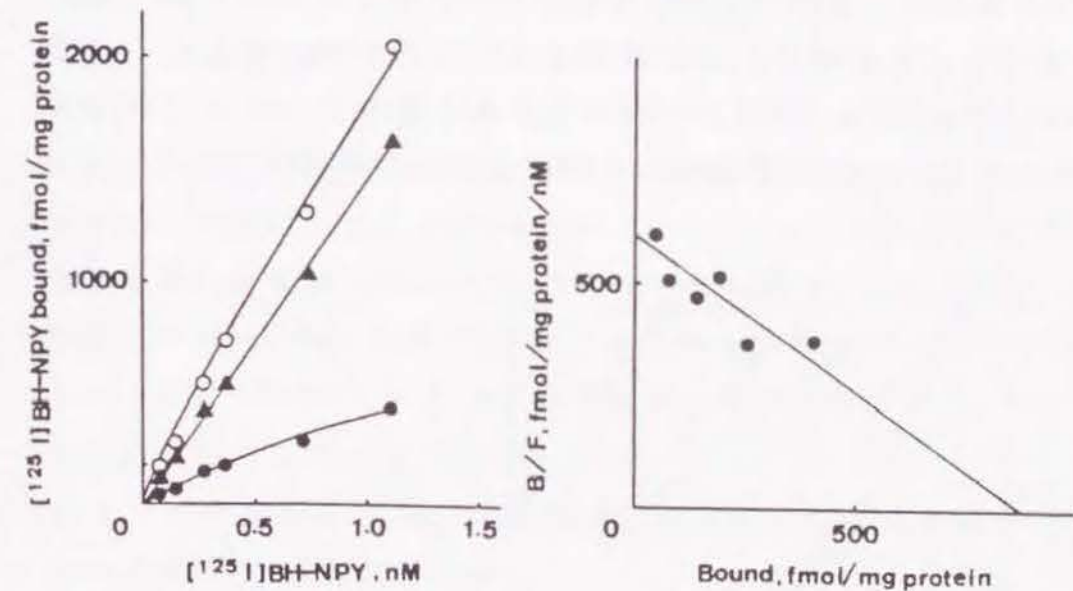


図1. ブタ平滑筋細胞に存在する、NPY結合部位。

(左)(○)全体の結合量;(●)特異的結合量;(▲)非特異的結合量
(右)NPY結合部位のScatchard解析

前章で述べたように、ブタ平滑筋培養細胞で、NPYは濃度依存的に一過性の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を起こす。そこで各種NPYのアナログを用いて、結合実験と細胞内 Ca^{2+} 濃度測定を行い、培養平滑筋細胞上のNPY受容体の解析を行った。その結果、P-NPY, H-NPYに加え、PYYも細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を引き起こし、 EC_{50} 値は $7.7 \pm 2.7 \text{ nM}$ で、P-NPYの値($6.6 \pm 1.1 \text{ nM}$)とほぼ等しかった(図2)。Y2受容体の選択的アゴニストであるNPYのC末端フラグメント、NPY(13-36)について調べたところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用が弱く、NPYに比べて約1/500であった。P-NPY, H-NPYさらにPYYとNPY(13-36)では、結合実験から得られた K_i 値と、 Ca^{2+} 濃度より得られた EC_{50} 値はよく一致した(図2)。HPP, RPPは Ca^{2+} 濃度を変化させなかったが、APPは 10^{-5} M ではわずかながら細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用が認められた(図2)(図3a)。

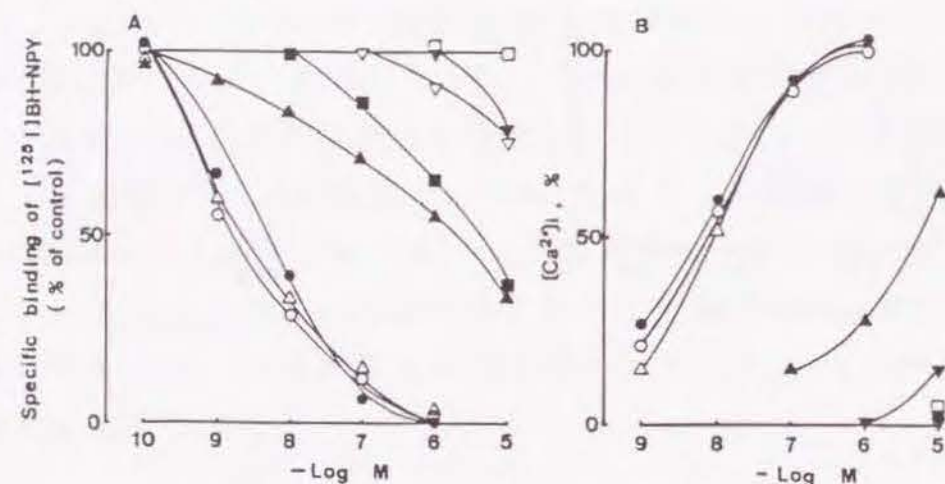


図2。(A)ブタ平滑筋細胞でのNPY結合部位に対する、NPY関連ペプチドの作用。
(B)NPY関連ペプチドの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用。
P-NPY(10^{-6} M)による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇値 $280 \pm 30 \text{ nM}$ を100%とした。
(■)HPP;(●)H-NPY;(▲)NPY(13-36);(□)NPY(25-36);
(△)PYY;(○)P-NPY;(▼)APP;(▽)RPP

以上のNPY関連ペプチドの細胞内 Ca^{2+} 上昇作用の EC_{50} 値と結合実験より得られた IC_{50} 値を表1に示した。NPY関連ペプチドによる、ブタ平滑筋細胞の結合実験から得られた IC_{50} 値と細胞内 Ca^{2+} 上昇作用からわかった EC_{50} 値には相関性があったがHPPでは認められなかった。そこでそれぞれのPPについて詳しく解析を行った。APPは 10^{-5} M では細胞内 Ca^{2+} 上昇作用は認められなかったが、 ^{125}I -BH-NPYの結合に対する IC_{50} 値は $4100 \pm 500 \text{ nM}$ であった。RPPで前処置しても、NPYによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇には影響はなかったが(図3a)、HPP, APPを前処理するとNPYによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は幾分阻害された(図3a)。HPPあるいはAPPが存在すると、NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の濃度依存曲線は右にシフトした(図3b)。つまりHPPあるいはAPP(10^{-5} M)存在下では、NPYの EC_{50} 値は、 $6.6 \pm 1.1 \text{ nM}$ から $63 \pm 23 \text{ nM}$ に、 $6.6 \pm 1.1 \text{ nM}$ から $17 \pm 5 \text{ nM}$ になった。Gaddumの式⁽⁵⁾, $(A'/A) - 1 = B/K_B$ にあてはめて解離定数 K_B を計算したところ⁽⁴⁾、HPPの K_B 値は $1300 \pm 300 \text{ nM}$ であった。ただし A' と A はそれぞれHPP存在下あるいは非存在下のNPYの EC_{50} 値である。またBはHPPの濃度 10^{-5} M である。同様にしてAPPについて K_B 値をもとめたところ、 $6500 \pm 1000 \text{ nM}$ であった。

表1。結合実験より得られた K_i 値、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用より得られた EC_{50} 値と K_B 値の比較。

	$[^{125}\text{I}]\text{BH-NPY}$ binding		$[\text{Ca}^{2+}]_i$	
	K_i (nM)	Increase EC_{50} (nM)	Inhibition K_B (nM)	
porcine NPY	3.5 ± 1.1	6.6 ± 1.1	---	
human NPY	5.1 ± 1.4	10.7 ± 3.7	---	
PYY	1.7 ± 0.4	7.7 ± 2.7	---	
NPY(13-36)	1000 ± 300	3400 ± 600	---	
NPY(25-35)	>10000	>10000	---	
human PP	4100 ± 500	>10000	1300 ± 400	
avian PP	>10000	>10000	6500 ± 1000	
rat PP	>10000	>10000	No effect	

$K_i = \text{IC}_{50} / (1 + C/K_d)$ の式から求めた。

IC_{50} は ^{125}I -NPYを50%阻害する値。

Cは ^{125}I -NPYの用いた濃度(0.1 nM)。Kdは解離定数(1.1 nM)である。

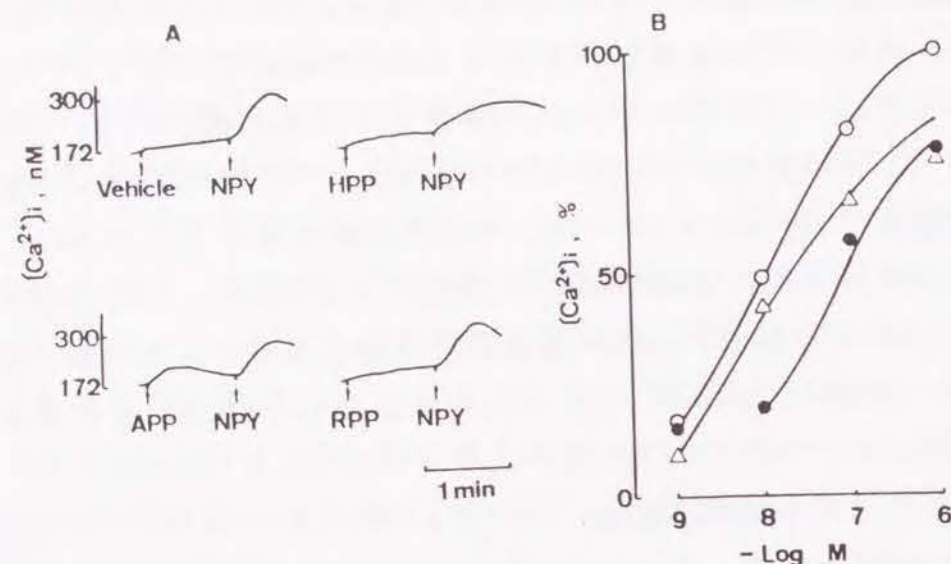


図3. NPYによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対する、PPファミリーペプチドの作用

(A) APP, HPP, RPPの作用 NPY(10^{-8}M)を加える1分前に各PP(10^{-5}M)を加えた。

(B) NPYによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対するAPP, HPPの効果。

P-NPY(10^{-6}M)による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇値 $280 \pm 30\text{nM}$ を100%とした。HPP(10^{-5}M)とAPP(10^{-5}M)はP-NPY(10^{-9}M - 10^{-6}M)を加える1分前に添加した。(●)HPP; (△)APP; (○)control

考察

ポストシナプス細胞である、ブタ平滑筋細胞に存在するNPY受容体について解析を行った。 ^{125}I -BH-NPYを用いた非特異的結合の割合は高く全結合の70%に達した。しかし実験を繰り返した結果、わずかながら特異的結合が確認された。結合平衡実験より得られた K_d 値は $1.1 \pm 0.2\text{nM}$ で、結合阻害実験より得られたP-NPYの K_i 値 $3.5 \pm 1.0\text{nM}$ に比べ少し小さかったが、ほぼ同程度の値であった。この K_d 値はラット脳(K_d 値: 0.38nM)⁽⁶⁾、ブタ脾臓(K_d 値: 0.53nM)⁽⁷⁾、ラット脾臓(K_d 値: 0.38nM)⁽⁸⁾、ラット血管(K_d 値: 1.1nM)⁽⁹⁾とほぼ似た値であった。結合実験の結果から、ブタ培養平滑筋細胞膜画分では、NPYのC末端フラグメントであるNPY(13-36)の親和力はNPYの1/200-1/300であった。そして細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇効果は、1/300-1/500であった。以上の結果を考慮してみると、Wahlestedtらが提唱したように⁽¹⁾、平滑筋上のNPY受容体はNPY(13-36)に親和性が低いことから、Y1タイプの受容体であることが示唆された。PYYは現在Y3タイプの受容体を区別するために用いられる。そこで次にPYYについて平滑筋上のNPY結合部位と、細胞内 Ca^{2+} 上昇作用について調べた。その結果PYYではNPYと同程度の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が認められ、NPYの結合部位に対する親和性はNPYとほとんど等しかった。つまり平滑筋上のNPY受容体は、Y3タイプではなくY1タイプであることがここでも確認された。PYYの親和力は、ラット小腸やブタ脳、さらにラット海馬の実験の値とよく一致していた⁽¹⁰⁻¹³⁾。APPはHPPやRPPと異なり、 10^{-5}M でわずかながら細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用が認められた。一方HPPは結合阻害実験より得られた K_i 値と、NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇の阻害効果から得られた K_B 値はよく一致した。NPYはそれ自身ホモ脱感作し、BKとAIIはヘテロ脱感作することを第2章で述べた。しかしこの場合、HPPがNPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を阻害するのは、HPPとNPYが脱感作し合うからではない。なぜならばHPPでは解離定数よりも高い濃度

(1300nM) でも細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起きないからである。一方APPの場合それ自身細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用がある。またAPPと同程度の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を起こすNPY(10^{-9}M)を前処理すると、NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が阻害される。

以上の結果を考え合せて、NPYとAPPはホモ脱感作することにより、NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を阻害するのであらうと考えられる。これらPPのNPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対する効果は、トリ、ヒト、ラットのPPで互いに異なるので、それぞれに特異的な作用であると考えられる。HPPは平滑筋の収縮や神経伝達物質の放出阻害、あるいはcAMPの産生阻害でアゴニストとして働くことは知られている(8, 9, 14)。しかしブタ培養平滑筋細胞ではアンタゴニストとして作用することが示されたが、この本来の理由と意味は現在明かでない。

以上の結果から、結論として、我々は培養平滑筋細胞でNPYによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用がY1受容体を通じて行われていることを明らかにした。

文献

- 1) Wahlestedt, C., Yanaihara, N. and Hakanson, R. Evidence for different pre- and post-junctional receptors for neuropeptide Y and related peptides. *Regul. Pept.*, 13 (1986)307-318
- 2) Sheikh, S., Hakanson, R. and Schwartz, T. Y1 and Y2 receptors for neuropeptide Y. *FEBS Lett.*, 245(1989) 209-214
- 3) Fuhlendorff, J., Gether, U., Aakerlund, L., Langeland-Johansen, N., Thøgersen, H., Melberg, S., Olsen, U., Thastrup, O. and Schwartz, T. [Leu31, Pro34]Neuropeptide Y: a specific Y1 receptor agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 87(1990)182-186
- 4) Tallarida, R., Cowan, A. and Adler, M. pA2 and receptor differentiation: a statistical analysis of competitive antagonism. *Life Sci.*, 25(1979)637-654
- 5) Gaddum, J. J. *Physiol.*, 89(1937)7p-9p
- 6) Undén, A., Tatemoto, K., Mutt, V. and Bartfai, T. Neuropeptide Y receptor in the rat brain. *Eur. J. Biochem.*, 145(1984)525-530
- 7) Lundberg, J., Hemsén, A., Larsson, O., Rudehill, A., Saria, A. and Fredholm, B. Neuropeptide Y receptor in pig spleen: binding characteristics, reduction of cyclic AMP formation and calcium antagonist inhibition of vasoconstriction. *Eur. J. Pharmacol.*, 145(1988)21-29
- 8) Higuchi, H., Costa, E. and Yang, H. Neuropeptide Y inhibits the nicotine-mediated release of catecholamines from bovine adrenal chromaffin cells. *J. Pharmac. Exp.*

- ther., 244(1988)468-474
- 9) Chang, R., Lotti, V. and Chen, T. Specific [³H]propionyl-neuropeptide Y(NPY) binding in rabbit aortic membranes: comparisons with binding in rat brain and biological responses in rat vas deferens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 151(1988)1213-1219
 - 10) Laburte, M., Chenut, B., Rouyer-Fessard, C., Tatemoto, K., Couvineau, A., Servin, A. and Amiranoff, B. Interaction of peptide YY with rat intestinal epithelial plasma membranes: binding of the radioiodinated peptide. *Endocrinology*, 118(1986)1910-1917
 - 11) Inui, H., Okita, M., Inoue, T., Sakatani, N., Oya, M., Morioka, H., Yokono, K., Mizuno, N. and Baba, S. Peptide YY receptors in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 150(1988)25-32
 - 12) Inui, H., Okita, M., Inoue, T., Sakatani, N., Oya, M., Morioka, H., Shii, K., Yokono, K., Mizuno, N. and Baba, S. Characterization of peptide YY receptors in the brain. *Endocrinology*, 124(1989)402-409
 - 13) Chang, R., Lotti, V., Chen, T., Cerino, D. and Kling, P. Neuropeptide Y (NPY) binding sites in rat brain labeled with ¹²⁵I-Bolton-Hunter NPY: Comparative potencies of various polypeptides on brain NPY binding and biological responses in the rat vas deferens. *Life Sci.*, 37(1985) 2111-2122
 - 14) Servin, A., Rouyer-Fessard, C., Balasubramaniam, A., Pierre, S. and Laburthe, M. Peptide YY and neuropeptide Y inhibits vasoactive intestinal peptide-stimulated adenosine 3'5'-monophosphate production in rat small intestine: structural requirements of peptides for

interaction with peptide YY preferring receptors.
Endocrinology, 124(1989)692-700

第4章

NPYのY1受容体にリンクしたGTP結合タンパク質

第2章で述べた様に、Y1受容体を介する情報伝達系は、イノシトール1, 4, 5三リン酸の産生を伴わず細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が起こる系とcAMPの産生阻害を起こす系の二つからなっていることがわかった。第2章では、NPYのターゲット細胞の一つである平滑筋細胞を用いて解析を行ったが、他のグループもほぼ同時に、平滑筋細胞以外のいくつかの培養細胞で同様の結果を示した⁽¹⁻⁵⁾。Y1受容体を介する2つの情報伝達系は、いずれの細胞でも、PTXの処理により消失することから、Y1受容体にはGTP結合タンパク質が関与し、2つの情報伝達系を調節していることが示唆されている。ヒトの神経上皮腫瘍細胞の一つであるSK-N-MCでは、Y1受容体が発現していることが報告されている⁽⁶⁻¹⁰⁾。ブタ平滑筋細胞に比べてこの細胞は増殖が速いことから、細胞レベルでのY1受容体アンタゴニストの探索に本細胞を用いるのは適当であると考えた。また植物抽出液には各種受容体アンタゴニストが豊富に含まれていることが広く知られている。そこでSK-N-MC細胞を用いて、植物抽出液中から、Y1受容体アンタゴニストを探索することにした。植物抽出液中からY1受容体アンタゴニストを探したところ、ある種の植物抽出液が強いNPYのY1受容体アンタゴニスト活性を示した。しかしそれらの植物はいずれもホルボールエステルを含んでいることで有名な植物であった。実際各種ホルボールエステルはNPYによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用を完全に阻害した。ホルボールエステルは、PI-PLC系を活性化させることが知られているエンドセリン(ET)の、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用にはほとんど影響を及ぼさなかった。つまりホルボールエステルの作用は、かなりY1受容体の情報伝達系に特異的であることがわかった。そこでホ

ルボールエステルを用いることにより、Y1受容体を介した2つの情報伝達系である、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇とcAMP産生阻害の系についてさらに詳しく解析できると考えた。Protein kinase C(PKC)の活性化剤であるホルボールエステルは、いくつかの細胞の情報伝達系を特異的に修飾することが、いままでに知られている⁽¹¹⁻¹⁴⁾。

方法

(1)試薬

P-NPYとエンドセリン-1(endothelin-1: ET-1)はペプチド研から購入した。1-オレオイル-2-アセチルグリセロール(1-Oleoyl-2-acetyl-glycerol:OAG), ホルボール12, 13-ジブチレート(phorbol 12, 13-dibutyrate:PDBu), 4-アルファ-ホルボール12, 13-ジブチレート(4-alpha-phorbol 12, 13-dibutyrate:4 α -PDBu), ホルボール12-ミリステート13-アセテート(phorbol 12-myristate 13-acetate:PMA), 4-O-メチルホルボール12-ミリステート13-アセテート(4-O-methylphorbol 12-myristate-13-acetate:MPMA)と百日咳毒素(per-tussis toxin:PTX)とスタウロスポリン(staurosporin)はフナコシの製品を使用した。フラ-2-AMは同仁化学研究所から購入した。^[125I]Bolton-Hunter NPY(^[125I]BH-NPY)はニューイングランドニュークリアー社の製品を使用した。

(2)細胞培養

ヒト神経腫瘍細胞SK-N-MCはAmerican Type Culture Collection(ATCC)から購入し、RPMI-1640培地に2mMグルタミンと10%のウシ胎児血清を添加した培地で、ブタ平滑筋細胞は、199培地に10mMHEPES(pH7.4)と10%のウシ胎児血清を添加した培地でともに培

養した。両方の細胞は、5%のCO₂を添加した容器の中37°Cで培養した。

(3)細胞内cAMP量の測定

RPMI1640培地に10mM HEPES (pH7.4)を加え、細胞を 1×10^6 /mlの濃度になるように懸濁した。その200 μ lを取り、37°Cで10分間プレインキュベーションしたのち、各種ホルボールエステルを加え1分間反応させ、10 μ Mフォルスコリンを単独またはNPY(10^{-7} M)と共に加えて、さらに2分間反応を続け、0.1N HClを200 μ l加えて反応を止め、凍結保存した。融解後0.1NのNaOH 200 μ lを加え中和し、アマーシャム社製のcAMP定量キットを用いてラジオイムノアッセイを行い、cAMP量を測定した。

(4)細胞内Ca²⁺濃度測定

125cm²の培養フラスコで培養した細胞をトリプシン処理してフラスコから剥した。遠心で細胞を集めた後、20mM HEPES(pH7.4)を添加したハanks緩衝液に細胞を 1×10^6 /mlの濃度になるように細胞を懸濁し、第2章で述べたように、細胞内Ca²⁺濃度を測定した。

(5)NPYと細胞との結合実験

poly-L-Lysでコートした12穴の細胞培養プレートに、細胞を培養した。2日間培養し、細胞密度が高くなるまで培養した後、20mMHEPESと1%ウシ血清アルブミンを加えたハanks緩衝液(pH7.4)で一回洗浄した。その後、1分間 10^{-6} M PMA で細胞を処理し、もう一度同じ緩衝液で洗浄した。結合実験は0.1nMの[¹²⁵I]BH-NPYを同じ緩衝液に加えて、37°C, 60分間行った。反応液を除いた後、1mlの氷冷した緩衝液で2度洗浄し反応を止めた。直ちに0.75mlの3M

酢酸、8Mの尿素と2%(v/v)のNonidet P40を含む液を加えて細胞を処理し、これを2回繰り返した後チューブに移し、 γ カウンターで放射能を測定した。

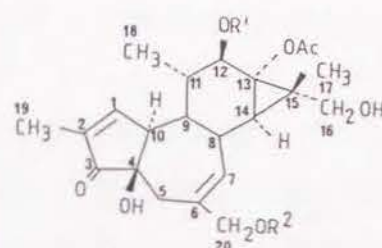
(6)植物抽出液の調製法

各種植物をメタノールで抽出し、最終濃度1mg/mlにし、これを植物抽出液として使用した。

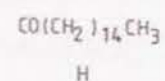
結果

約400種の植物のメタノール抽出液について、NPYのSK-N-MC細胞内Ca²⁺濃度上昇作用に対する抑制効果を調べた結果、7種類の植物抽出液に強い阻害活性が認められた。7種のうち5種は、アブラギリ、シナアブラギリ、コショウノキ、ゲンカ、ナツトウダイであった。これらはいずれも図1に示したように、ホルボールエステルを含んでいる。Y1受容体が発現しているブタ培養平滑筋細胞に対しても、これらの植物抽出液の効果を調べた。アブラギリ抽出液は、NPYによる細胞内Ca²⁺濃度上昇を阻害したが、AIIの細胞内Ca²⁺濃度上昇効果は阻害しなかった。アブラギリの抽出液の添加前にPKCの阻害剤であるスタウロsporinで処理すると、アブラギリの阻害作用は消失した(図2)。

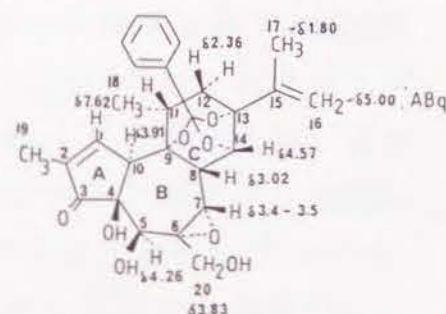
<i>Aleurites cordata</i>	アブラギリ
<i>Aleurites fordii</i>	シナアブラギリ
<i>Daphne kiusiana</i>	コショウノキ
<i>Daphne genkwa</i>	ゲンカ
<i>Euphorbia sieboldiana</i>	ナツトウダイ



Aleurites fordii Hemsl.



Aleurites fordii



Empirical formula C₂₇H₃₀O₈

M.P. 194-196°C

U.V. (EtOH): λ_{max} (ε): 243 (8950), 337 (84) nm

C.D. (MeOH): 342 ([α] = +3050), 243 ([α] = -8300) nm

¹H-NMR (CDCl₃, 100 MHz)

Daphne kiusiana

Daphne genkwa

図1。ホルボールエステルを含んでいる代表的な植物と植物由来のホルボールエステル

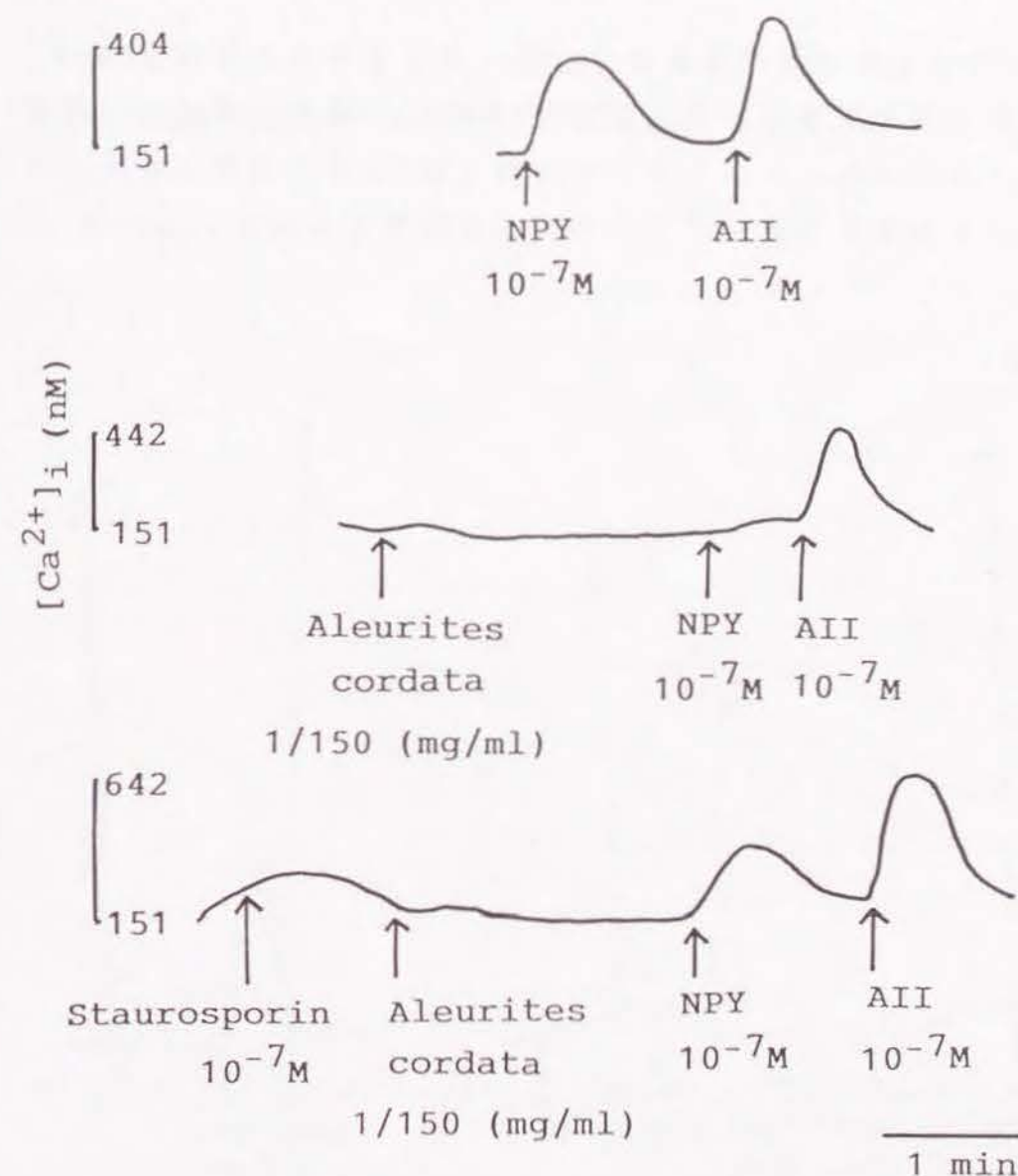


図2。平滑筋細胞での、AIIとNPYによる細胞内Ca²⁺濃度上昇作用に対するアブラギリ(*Aleurites cordata*)の抽出液の作用とスタウロスピリンの影響

SK-N-MCについても同様の実験を行った。ナットウダイはNPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を阻害したが、ET1の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対しては影響を与えなかった。ナットウダイの前にPKCの阻害剤であるスタウロスポリンを処理すると、ナットウダイの阻害作用はなくなった(図3)。

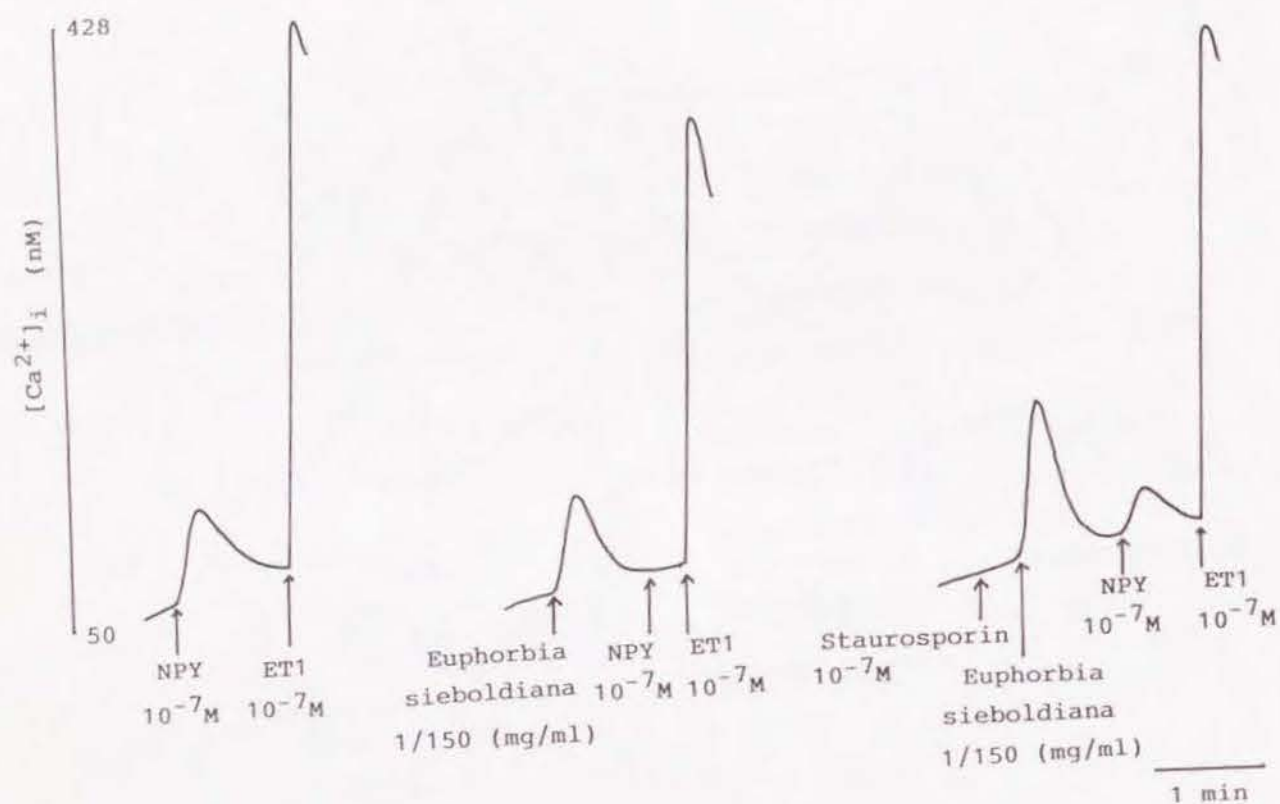


図3。SK-N-MC細胞での、NPYとET1による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対するナットウダイ(*Euphorbia sieboldiana*)の抽出液の作用とスタウロスポリンの影響

ナットウダイの代わりに、代表的なホルボールエステルの一つであるPMAを用いても、同様の結果が得られた(図4)。

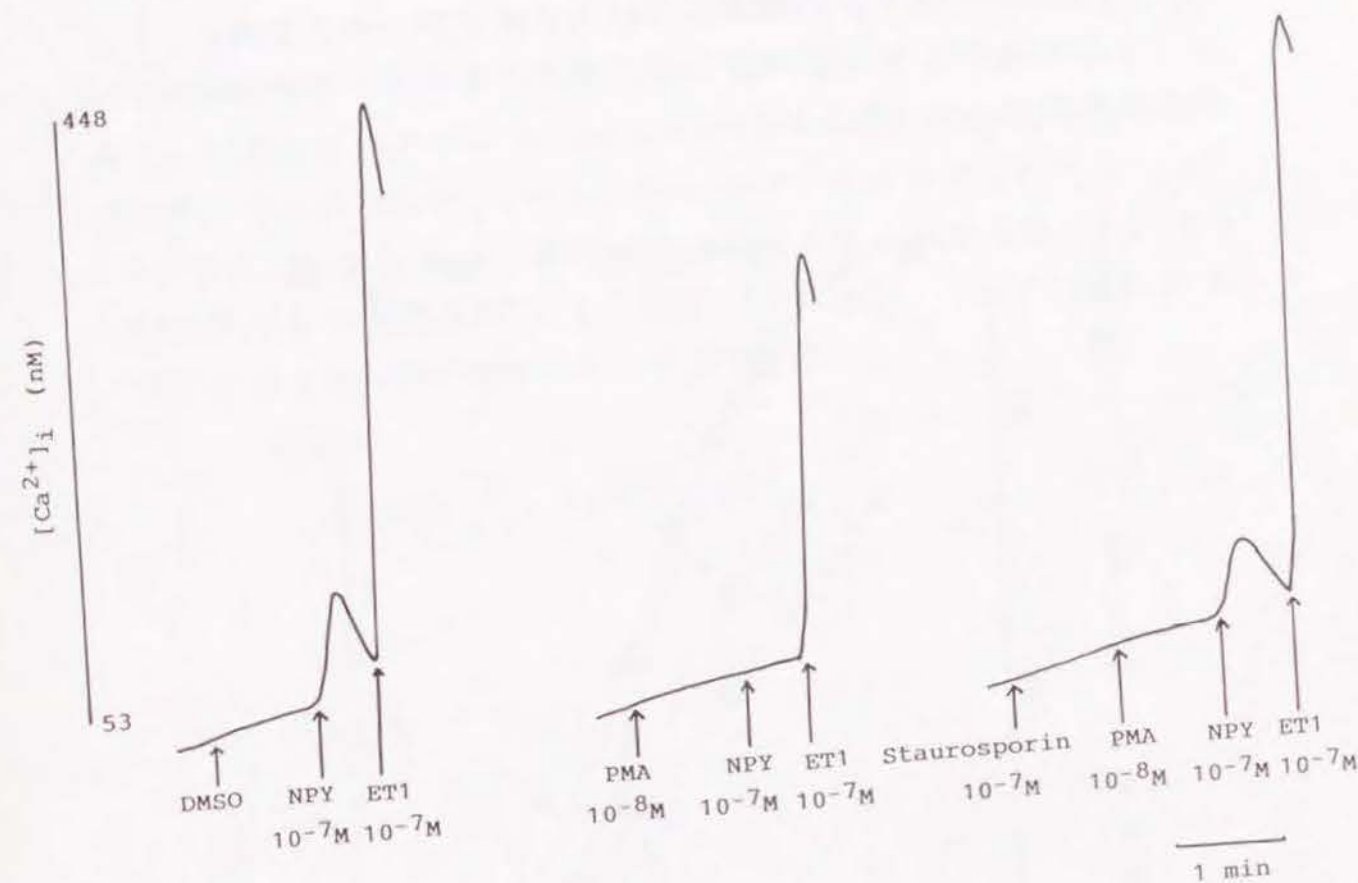


図4。SK-N-MC細胞での、NPYとET1による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対するPMAとスタウロスポリンの影響

以上の結果からホルボールエステルがPKCを活性化し、特異的にY1型受容体の情報伝達系を阻害することがわかった。そこでホルボールエステルの阻害作用を利用して、Y1型受容体の情報伝達系について解析を行うことにした。NPYによる反応が常に一定に検出でき、増殖速度の大きいヒト神経腫瘍細胞SK-N-MCを用いて実験を行った。

SK-N-MC細胞はY1受容体が発現していることが知られている(6-10)。そこでSK-N-MCが実際Y1型受容体を持っているか確認のため結合実験を行った(図5)。

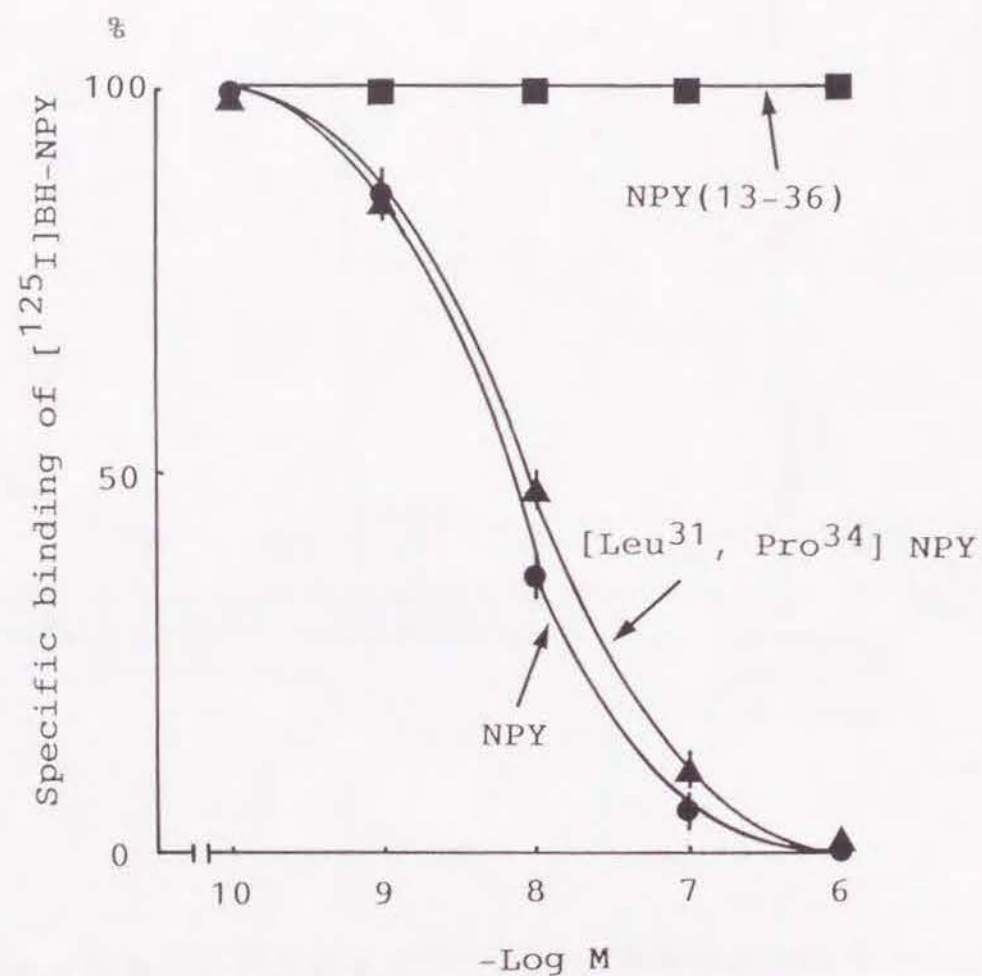


図5. SK-N-MC細胞での、NPY結合部位の解析
(■)NPY(13-36); (●)NPY; (▲)[Leu31][Pro34]NPY

Y2受容体のアゴニストであるNPY(13-36)はほとんど結合せず、Y1受容体の特異的アゴニストである[Leu31, Pro34]NPYはNPYと同様の親和力を持っていた。つまりSK-N-MC細胞上にはY1受容体が発現していることが確認された。第2章で述べたように、Y1受容体を介した情報伝達系は、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇とcAMPの産生阻害の2つからなっていることがわかった。そこでこれらの情報伝達系がSK-N-MC細胞でもY1受容体とリンクしているかどうかを調べた。結合実験の場合と同様に、Y2受容体のアゴニストであるNPY(13-36)はNPYやY1受容体のアゴニストである[Leu31, Pro34]NPYに比べて作用が弱く、それらの1/100程度しか細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を起こさなかった(図6)。またcAMPの産生阻害活性もNPY(13-36)はNPYや[Leu31, Pro34]NPYに比べて活性が弱く、1/100程度であった(図7)。

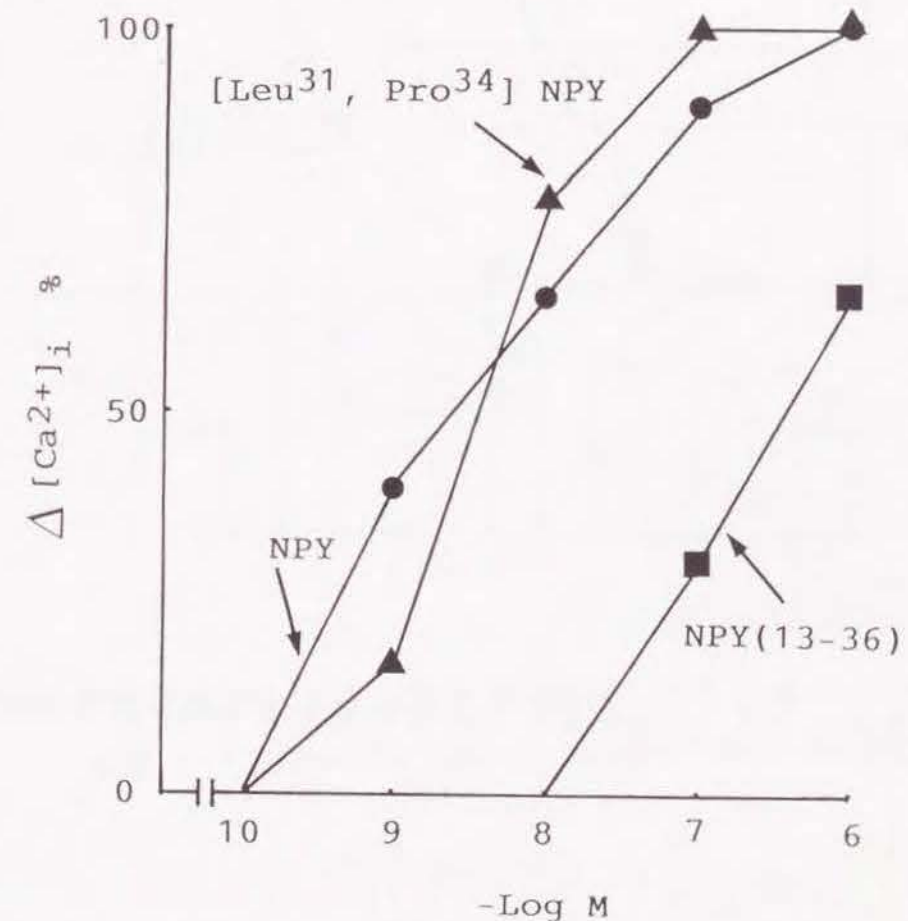


図6. SK-N-MC細胞での、NPY関連ペプチドの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用
(■)NPY(13-36); (●)NPY; (▲)[Leu31][Pro34]NPY

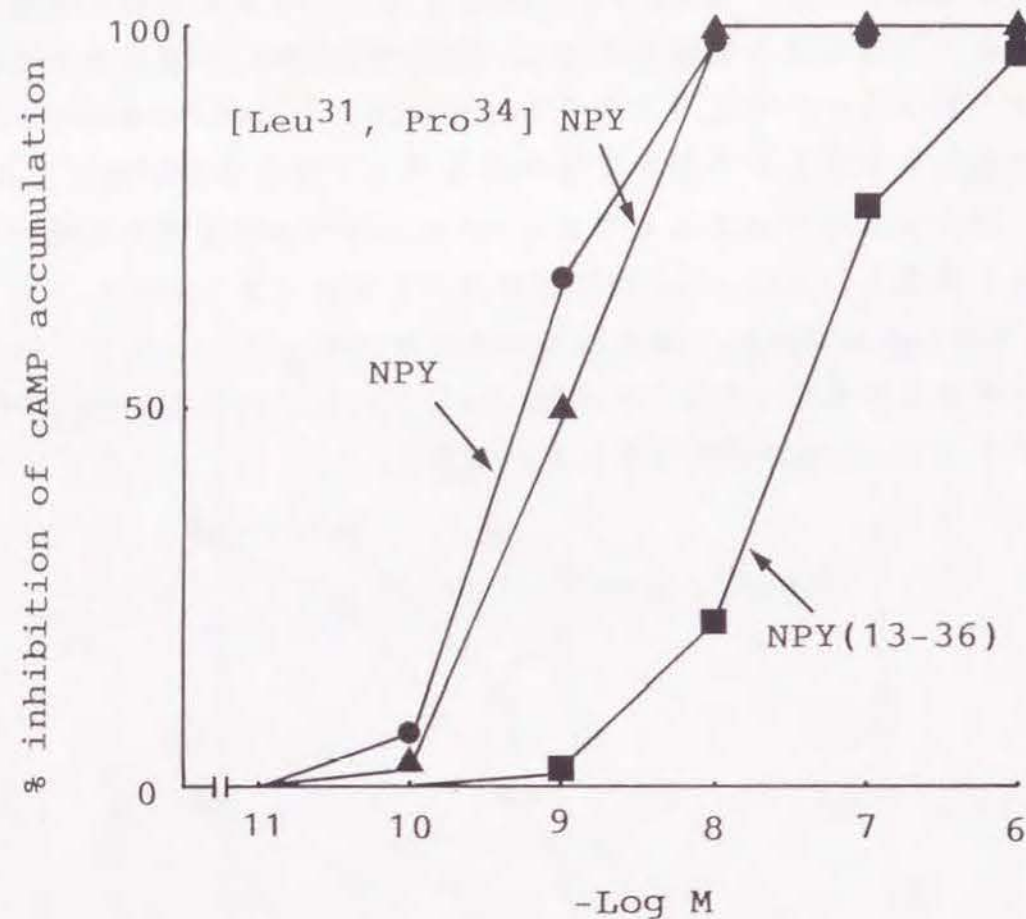


図7。SK-N-MC細胞での、NPY関連ペプチドのcAMP産生阻害作用
(■)NPY(13-36); (●)NPY; (▲)[Leu³¹][Pro³⁴]NPY

これらの結果から以前報告されていた様に⁽⁷⁾、ヒト神経腫瘍細胞SK-N-MCでは二つの情報伝達系はY1受容体にカップルしていることが確認された。次にこの二つのNPYの情報伝達系に対するPMAの効果調べた。細胞を 10^{-8} MのPMAで1分間前処置すると、NPYによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は完全に抑えられたが、ET1による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇はほとんど影響が見られなかった(図4)。またスタウロsporin(10^{-7} M)をPMA添加前に加えておくと、PMAの阻害作用は消失した。一方、NPYによるcAMPの産生阻害に対しては、 Ca^{2+} 濃度上昇とは異なり、PMA前処理による抑制効果は部分的であった(図8)。

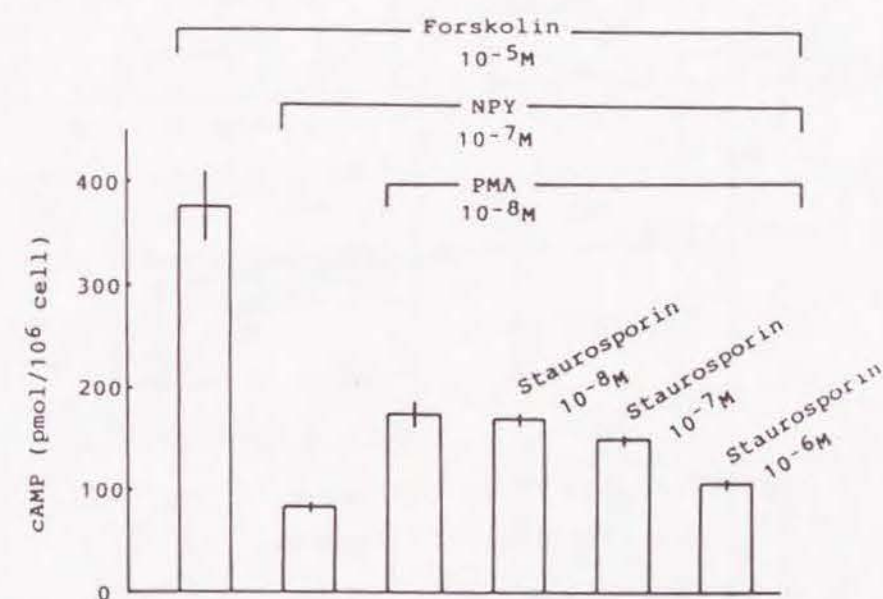


図8。NPYのcAMP産生阻害作用に対するPMAとスタウロsporinの影響。

次に各種ホルボールエステルを用いてさらに詳しく解析してみた。
図9に示したように、NPYの両方の情報伝達系は、
PMA PDBu > MPMA > 4 α PDBuの順で阻害された。

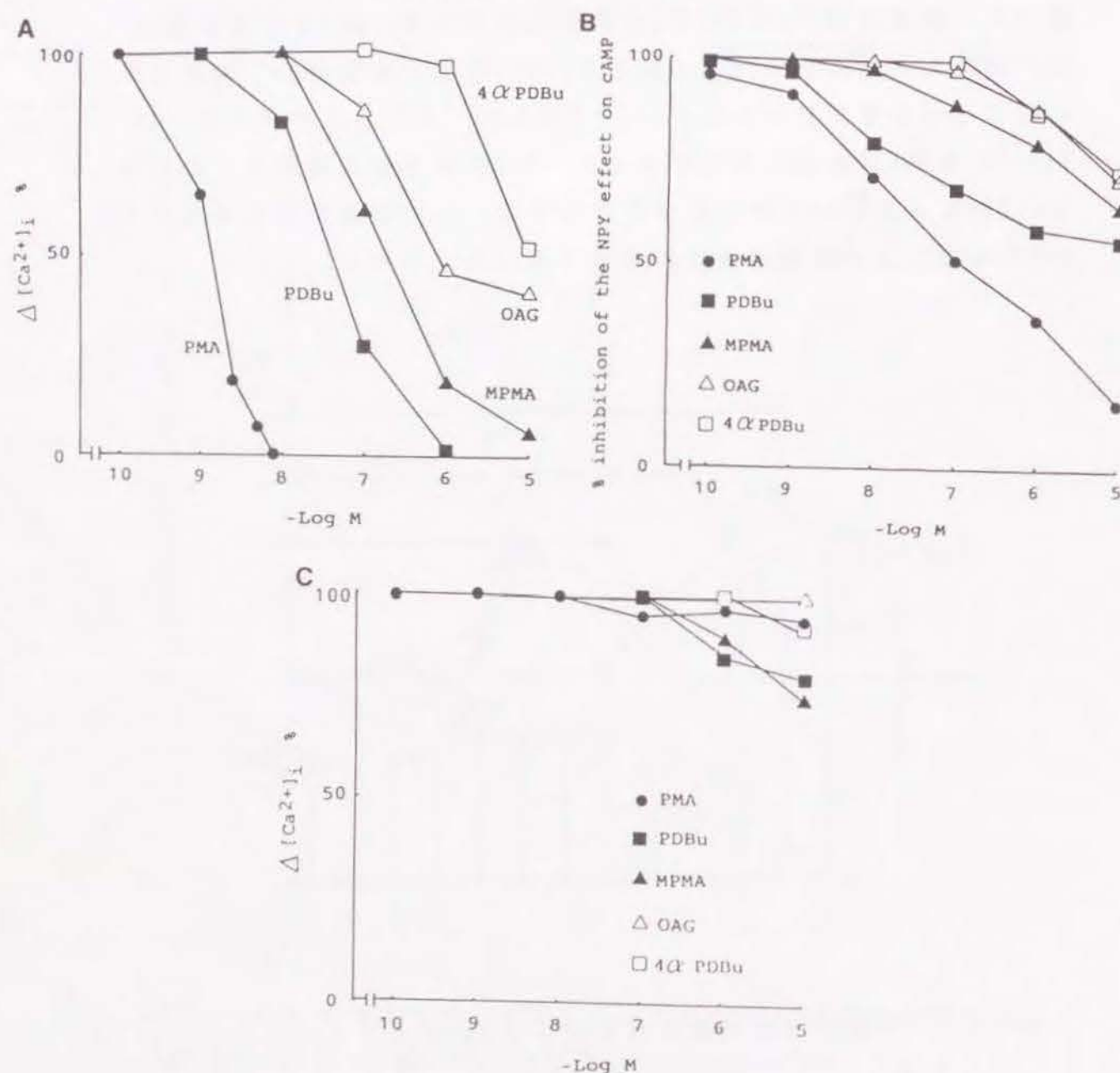


図9。(A)NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用，(B)NPYのcAMP産生阻害作用，(C)ET1の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対する各種ホルボールエステルとOAGの影響。

膜透過性ジアシルグリセロールOAGは活性型ホルボールエステルであるPMAやPDBuに比べて阻害効果は小さかったが、NPYの二つの情報伝達系に対しては同様の阻害効果を示した。一方ET1による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇に対するホルボールエステルとOAGの効果を調べたが(図9c)、ホルボールエステルもOAGもほとんど影響を与えなかった。10 $^{-7}$ MのPMAを一日間細胞に作用させ、PKCをダウンレギュレーションさせた条件で、NPYの情報伝達系の変化に対するPMAの影響を調べた。10 $^{-6}$ MのPMAで1分間前処理しても、NPYによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇とcAMP産生阻害はいずれも影響を受けなかった(図10)。

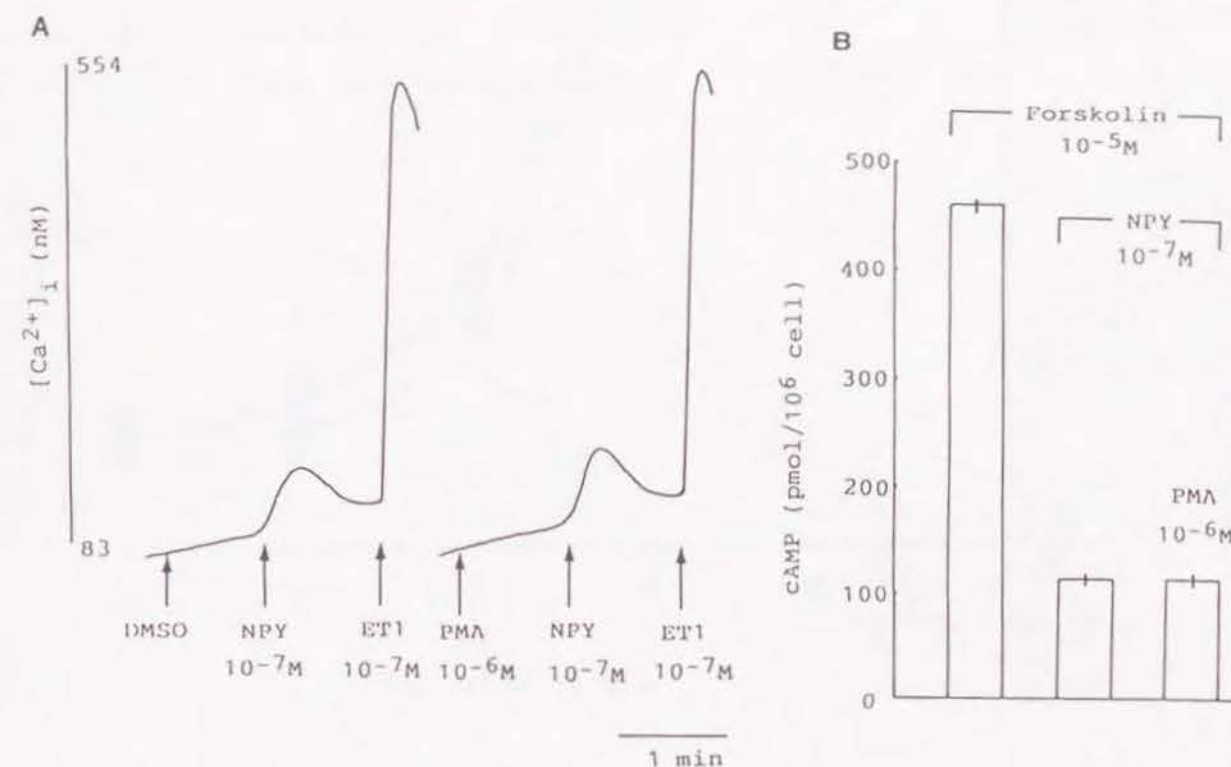


図10。(A)NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用，(B)NPYのcAMP産生阻害作用に対するPMA(10 $^{-7}$ M, 1日前処理)の影響。

次にPMAの阻害効果について、NPYとY1受容体の結合に対するPMAの影響を調べたが、図11に示すように、細胞をPMAで1分間処理してもNPYの細胞あたりの結合には変化は認められなかった。

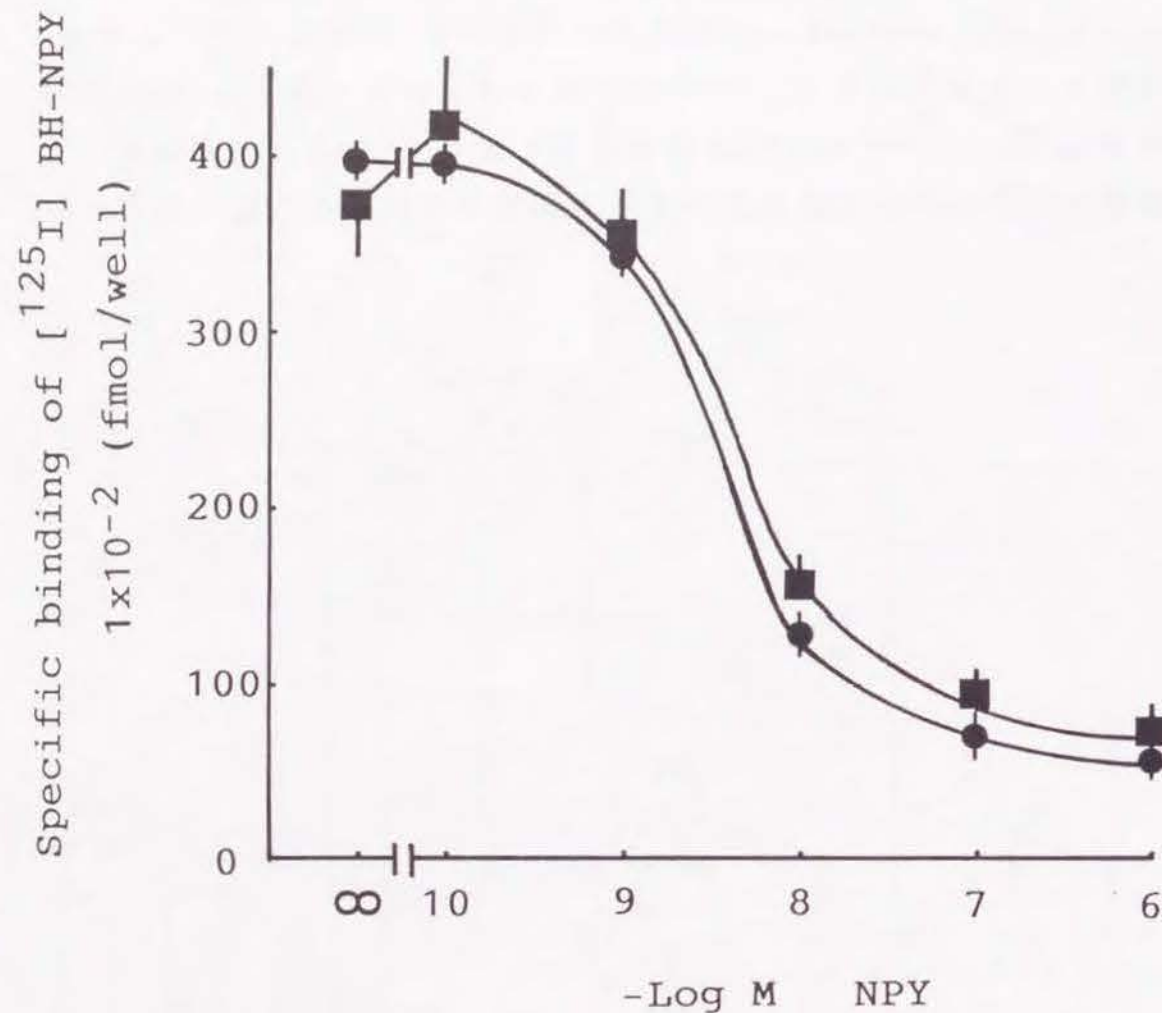


図11. PMA(10^{-6} M, 1分間)処理細胞(■)と未処理細胞(●)でのNPY結合部位の解析。

PTXはそれに感受性のGTP結合タンパク質をADPリボシル化して、このGTP結合タンパク質を介する情報伝達系を機能不能にする作用がある。第2章でのブタ平滑筋細胞やその他の細胞について、Y1受容体はPTX感受性GTP結合タンパク質とカップルしており、従ってPTX処理によりY1受容体を介する情報伝達系は働かなくなることが知られている。そこでSK-N-MC細胞をPTX 100ng/mlで4時間処理して、NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇とcAMP産生阻害作用への影響を調べたところ、PTXによって、NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇効果は消失したが、ET1による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は影響を受けなかった(図12)。

Pertussis toxin 100 (ng/ml)
4 hour pre-treatment

Control

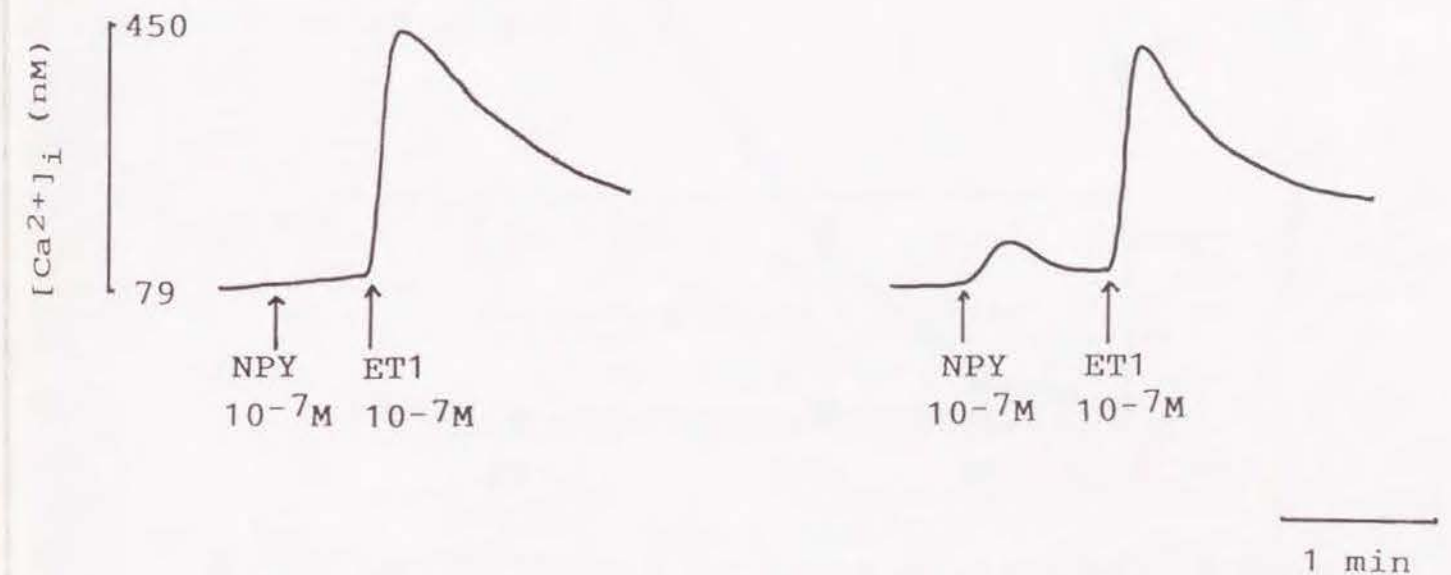


図12. NPYとET1の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対するPTXの作用。
(左)PTX処理細胞(100ng/ml, 4時間) (右)未処理細胞

またNPYのcAMP産生阻害効果も認められなくなった(図13)。次にこれらY1受容体を介する2つの情報伝達系の、PTX感受性を比較した。その結果細胞内 Ca^{2+} 動員効果は、cAMPの産生阻害効果よりも、約30倍感受性が高かった(図14)。

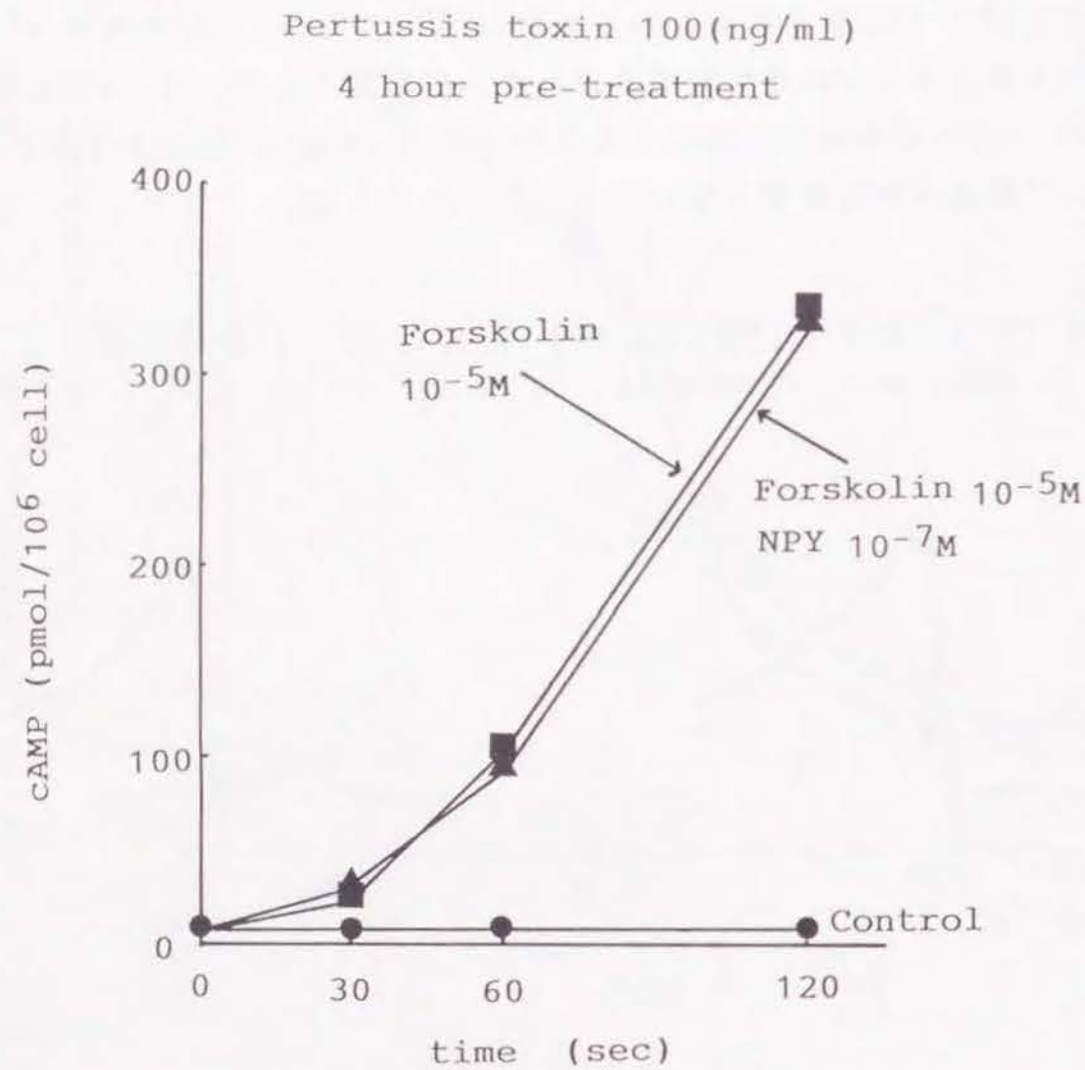


図13. NPYのcAMP産生阻害作用に対するPTXの作用。
PTXは100ng/ml, 4時間処理を行った。
(■) フォルスコリン($10^{-5}M$)
(●) 未処理(control)
(▲) フォルスコリン($10^{-5}M$) + NPY($10^{-7}M$)

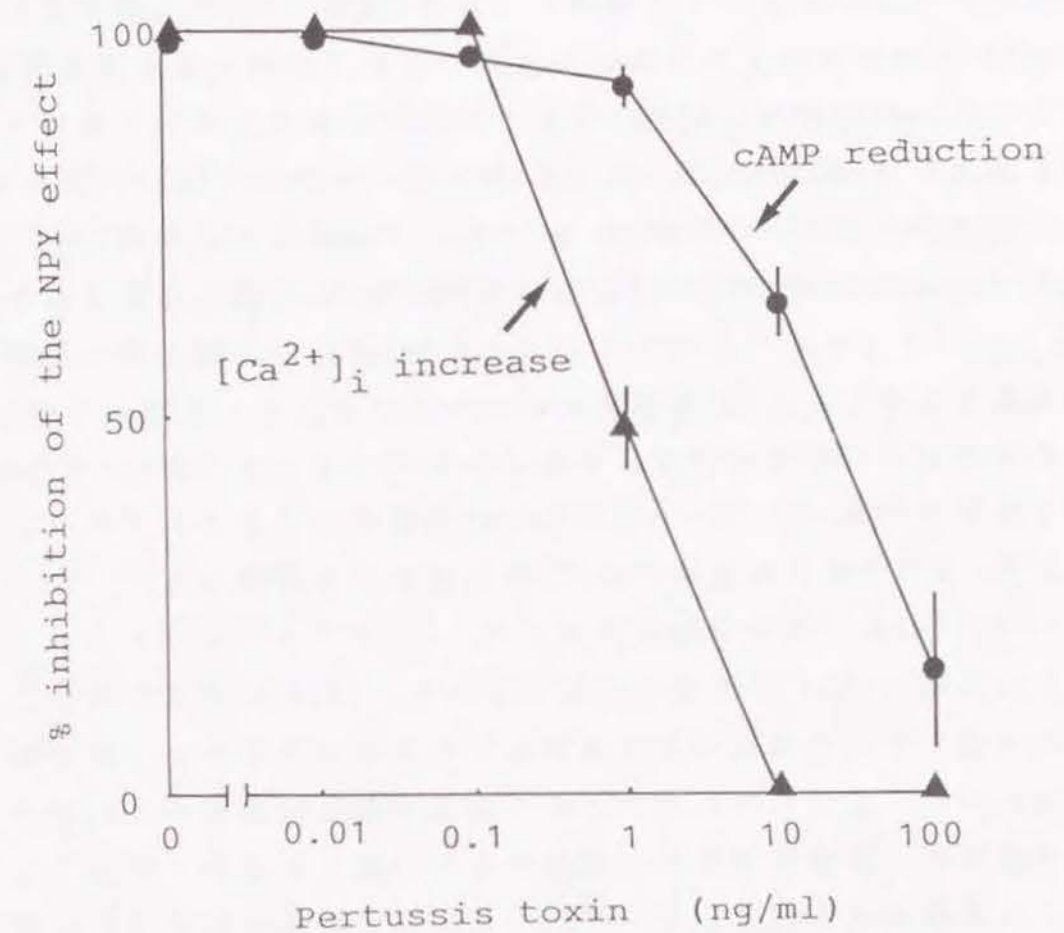


図14. (●) NPY cAMP産生阻害作用と(▲) NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用に対するPTXの感受性
PTXは0-100ng/ml, 4時間処理を行った。

考察

活性型ホルボールエステルの一つであるPMAは、NPYのY1受容体を介した2つの情報伝達、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇と、cAMP産生減少を共に阻害した。PMAはNPYのcAMP系に対する作用よりも細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用の方を約100倍強く阻害した。ホルボールエステルのY1受容体を介した情報伝達系への作用は、以下の四つの理由によりPKCを介した作用であることが示唆された。(1)内在性のPKCの活性化剤であるOAGなどのジアシルグリセロールが二つのNPYのY1受容体を介した情報伝達系を阻害した。(2)各種ホルボールエステルのY1受容体を介した情報伝達系への阻害作用は、各種ホルボールエステルのPKCへの活性化と相関性があった^(15, 16)。(3)PKCの阻害剤であるスタウロスピリンが、NPYの情報伝達系へのPMAの阻害作用を解消した。(4) 10^{-7}M のPMAを一日間細胞に作用させ、PKCをダウンレギュレーションさせた時、PMAの阻害効果はなくなった。PKCはY1受容体を介した情報伝達のどこを磷酸化して阻害しているのだろうか。ある種の受容体では、ホルボールエステルの細胞の情報伝達系への阻害作用の作用点が、受容体であり、受容体をリン酸化することにより行われている例が知られている⁽¹²⁾。しかしY1受容体の場合はこの場合とは異なっていると考えられる。なぜならば、PMAを未処理の時、あるいは処理の時の本細胞のY1受容体の結合部位と親和力が変化しないからである。ではGTP結合タンパク質以後の情報伝達エフェクター部位がその作用点であろうか。しかし、PMAはETによる細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を阻害しないし、NPYを作用させていない非刺激時のcAMP量や、フォルスコリン刺激した時のcAMP量を変化させていない。つまりホルボールエステルの作用点は、GTP結合タンパク質以後の情報伝達系のエフェクター部位でもないと考えられる。以上の結果を考えあわせてみて、ホルボールエステルの作用点は、GTP結合タンパク質ではないかと考えられた。最近になり実際PKCによりGTP結合タ

ンパク質がリン酸化されることが報告されている⁽¹⁷⁾。そこでY1受容体の二つの情報伝達系にカップルしているGTP結合タンパク質が異なるものであり、異なるホルボールエステル感受性を持っていることが予想された。Y1受容体にカップルしているGTP結合タンパク質はPTX感受性であることが知られている⁽¹⁸⁾。そこで二つの情報伝達系にカップルしているGTP結合タンパク質の、PTX感受性を調べたところ、約30倍異なっていることが解った。つまりこれまでの結果から、Y1受容体にカップルしているGTP結合タンパク質は、異なるホルボールエステル感受性と、異なるPTX感受性を持った別々のものであることがわかった。

文献

- 1) Edvinsson, L., Hakanson, R., Wahlestedt, C. and Uddman, R. Effects of neuropeptide Y on the cardiovascular system. *Trends Pharmacol. Sci.*, 8(1987) 231-235
- 2) Emoson, P. and DeQuidt, M. NPY-a new member of the pancreatic polypeptide family. *Trends Neurosci.*, 11(1984) 31-35
- 3) Walker, P., Grouzmann, E., Burnier, M. and Waeber, B. The role of neuropeptide Y in cardiovascular regulation. *Trends Pharmacol. Sci.*, 12(1991)111-115
- 4) Wahlestedt, C., Grundemar, L., Hakanson, R., Heilig, M., Shen, G., Zukowska-Grojec, Z. and Reis, D. Neuropeptide Y receptor subtypes, Y1 and Y2. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 611 (1990)7-26
- 5) Motulsky, H. and Michel, M. Neuropeptide Y mobilizes Ca^{2+} and inhibits adenylate cyclase in human erythroleukemia cells. *Am. J. Physiol.*, 255(1988)E880-E885
- 6) Michel, C., Feth, F., Stieneker, M. and Rascher, W. NPY and carbachol raise Ca^{2+} in SK-N-MC cells by three different mechanisms. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 345(1992)370-374
- 7) Aakerlund, L., Gether, U., Fuhlendorff, J., Schwartz, T. and Thastrup, O. Y1 receptors for neuropeptide Y are coupled to mobilization of intracellular calcium and inhibition of adenylate cyclase. *FEBS Lett.*, 260(1990) 73-78
- 8) Olasmaa, M., Pahlman, S. and Terenius, L.

- β -adrenoceptor, vasoactive intestinal polypeptide(VIP) and neuropeptide tyrosine(NPY)receptors functionally coupled to adenylate cyclase in the human neuroblastoma SK-N-MC cell line. *Neurosci. Lett.*, 83(1987)161-166
- 9) Gordon, E., Kohout, T. and Fishman, P. Characterization of functional neuropeptide Y receptors in a human neuroblastoma cell line. *J. Neurochem.*, 55(1990)506-513
- 10) Lobaugh, L. and Blackshear, P. Neuropeptide Y binding and inhibition of cAMP accumulation in human neuroepithelioma cells. *Am. J. Physiol.*, 258(1990)C913-C922
- 11) Liu, Y. and Albert, P. Cell specific signaling of the 5-HT1A receptor. *J. Biol. Chem.*, 266(1991)23689-23697
- 12) Raymond, J. Protein kinase C induced phosphorylation and desensitization of the human 5-HT1A receptor. *J. Biol. Chem.*, 266(1991)14747-14753
- 13) Ryu, S., Kim, U., Wahl, M., Brown, A., Carpenter, G., Huang, K. and Rhee, S. Feedback regulation of phospholipase C- β by protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, 265(1990)17941-17945
- 14) Bell, J., Buxton, I. and Brunton, L. Enhancement of adenylate cyclase activity in S49 lymphoma cells by phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, 260(1985)2625-2628
- 15) Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, 257 (1982)7847-7851
- 16) Blumberg, P., Jaken, S., Konig, B., Sharkey, N., Leach, K., Jeng, A. and Yeh, E. Mechanism of action of the phorbol ester tumor promoters: specific receptors for

lipophilic ligands. Biochemical Pharmacol., 33(1984)
933-940

17) Eisenberg, R. GTP-binding proteins as possible targets
for protein kinase C action. Trends Biochem. Sci., 14
(1989)355-357

18) Feth, F., Rascher, W. and Michel, M. G-protein coupling
and signalling of Y1-like neuropeptide Y receptors in
SK-N-MC cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.,
344(1991)1-7

第5章

平滑筋細胞に対するNPYの細胞増殖作用について

Lundbergらによると、脾臓の交感神経系を低頻度電気刺激すると、プレシナプスから放出される神経伝達物質はNEである。しかし高頻度でかつ連続的な刺激を行った時には、すぐにNEは放出しつくされ枯渇する。一方NPYは持続的かつ漸増的に放出がおけると報告されている⁽¹⁾。強くかつ持続的な交感神経系に対する刺激は、一種の興奮状態とストレス状態を起こしていることであり、これらの要因は動脈硬化と深く関わりあっていることはよく知られている。実際交感神経系の興奮は動脈硬化の一つの要因であることが報告されている⁽²⁾。以上の事柄を考え合わせてみて、NPYが動脈硬化に関わりあっている可能性が示唆された。動脈硬化の引き金は、血管の平滑筋細胞が血管内膜へ遊走し、増殖をおこすことである⁽³⁾。実際各種神経伝達物質が、細胞増殖作用を持っていることが知られている⁽⁴⁾。

第1-3章に記したように、ブタ平滑筋細胞でNPYは結合部位を有し、NPYが細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を起こすことがわかった。次にNPYとその関連ペプチドがブタ平滑筋細胞に対し細胞増殖作用があるかどうか調べるためにまず、NPYがDNA合成促進作用を有するかどうか検討した。

方法

(1) 試薬

インスリンはペプチド研から購入した。 $[^3H]$ チミジン

(thymidine)はアマーシャム社から購入した。

(2)細胞培養

ブタ平滑筋細胞は第2章に記した様に、Rossらの方法に従い⁽⁵⁾、胸部大動脈から単離した。細胞はダルベッコの変法培地に10%のウシ胎児血清と10mM HEPES(pH7.4)と抗生物質を加えた培地中で、37°Cで培養した。細胞は細胞密度が高くなるまで培養し、継代数が3-8代までのものを使用した。

(3)細胞内Ca²⁺濃度測定

細胞内Ca²⁺濃度測定は、第2章に記したように行った。

(4)細胞のDNA合成の測定

細胞のDNA合成の測定は花崎らの方法に従って行った⁽⁶⁾。24穴のプラスチックフラスコでブタ平滑筋細胞を、10%の牛胎児血清を加えたダルベッコの変法培地で培養した。細胞密度が高くなった後、牛胎児血清を除き、5μg/mlのトランスフェリンと0.5mg/mlのウシ血清アルブミンと10mM HEPES(pH7.4)を加えたダルベッコの変法培地でさらに48時間培養した。その後刺激因子を加え18時間反応後、[³H]チミジン0.5μCiを加え、さらに6時間培養した。そしてトリクロロ酢酸の不溶解画分を抽出し、放射能を測定し、その値を細胞のDNA合成量とした⁽¹³⁾。

結果

図1にまず平滑筋細胞での、インスリン存在下及び非存在下でのNPYのDNA合成促進作用の結果を示した。増殖を停止した細胞にNPYを24時間作用させたが、明らかなDNA合成促進は観察されなかった。しかしインスリン1μM存在下では、NPYは濃度依存的に細胞のDNA合成を促進した。NPYのDNA合成促進作用のEC50値は約10⁻⁸Mで、最大のDNA合成活性はNPYが10⁻⁶Mの時認められた。10⁻⁶MのNPYのDNA合成促進作用は、5%ウシ胎児血清を添加した場合の増殖促進活性の約5%であった。

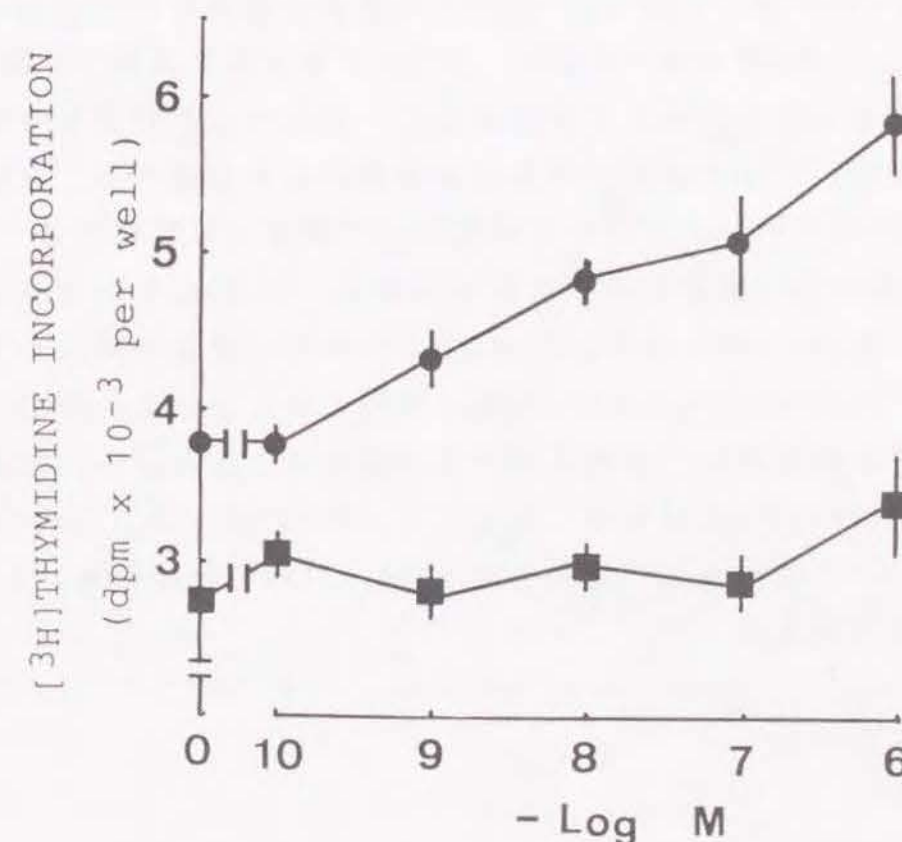


図1. NPYのDNA合成促進作用とインシュリンの添加効果。
(■)インシュリン未添加, (●)1μMインシュリン添加
それぞれの値=平均値±SEM

無刺激時の酸不溶性DNA画分への $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み値は $2545 \pm 155\text{dpm}$ であった。 10^{-6}M のNPY刺激時は $5210 \pm 145\text{dpm}$ で、5%ウシ胎児血清を加えた時は、 $56920 \pm 3100\text{dpm}$ であった。NPYの平滑筋細胞のDNA合成促進作用を、さらに詳しく調べるために、NPYの関連ペプチドを用いて実験を行った。図2に示したように、NPYと[Leu31, Pro34]NPYは同程度のDNA合成促進作用が、濃度依存的に認められた。一方NPYのC末端フラグメントの一つでY2受容体のアゴニストであるNPY(13-36)は、NPYに比べて約1/600のDNA合成促進作用しか認められなかった。HPPは 10^{-6}M の濃度でもDNA合成促進作用はなかった。次に細胞を 100ng/ml のPTXで3時間処理したところ、NPYと[Leu31, Pro34]NPYとNPY(13-36)のDNA合成促進作用は消失した(図3a)。第2章で述べた様に、NPYはブタ平滑筋細胞で、細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させることがわかった。そこでその作用と今回実験を行ったNPYのDNA合成促進作用が相関性があるか調べることにした。そこでNPYのアナログについて細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇活性を調べた。NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用の EC_{50} 値は、 $10.0 \pm 0.4\text{ nM}$ であった。[Leu31, Pro34]NPYの場合 EC_{50} 値は $12.5 \pm 0.4\text{ nM}$ であった。一方、NPY(13-36)はNPYに比べて約1/200の活性しかなかった。HPPは 10^{-6}M の濃度でも細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用は認められなかった。細胞を 100ng/ml のPTXで3時間処理したところ、NPYと[Leu31, Pro34]NPYとNPY(13-36)の細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用は、DNA合成促進作用と同様に消失した(図3b)。

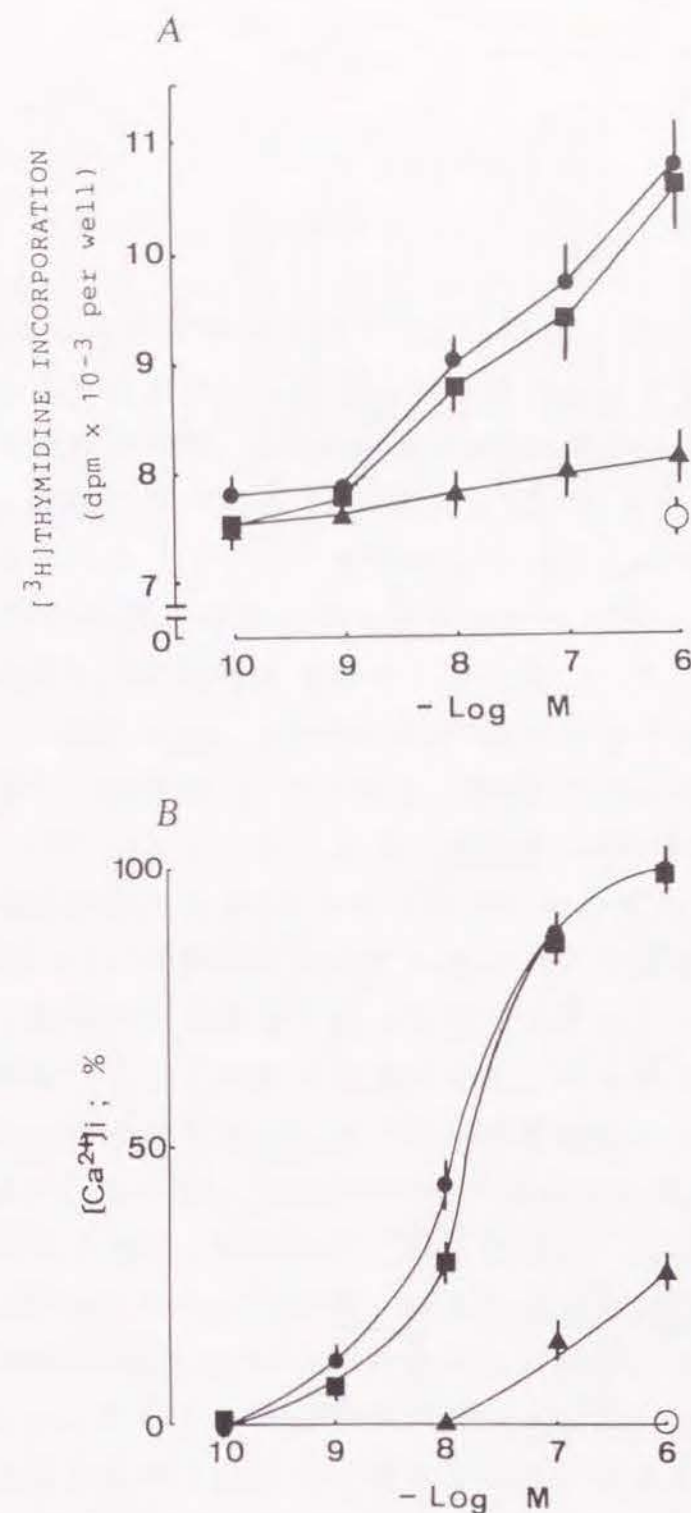


図2。(A)NPYとその関連ペプチドのDNA合成促進作用と
(B)細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用。
(■)[Leu31, Pro34]NPY; (●)P-NPY; (▲)NPY(13-36); (○)HPP
NPY(10^{-6}M)による細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇値(280nM)を100%とした。
それぞれの値=平均値 \pm SEM

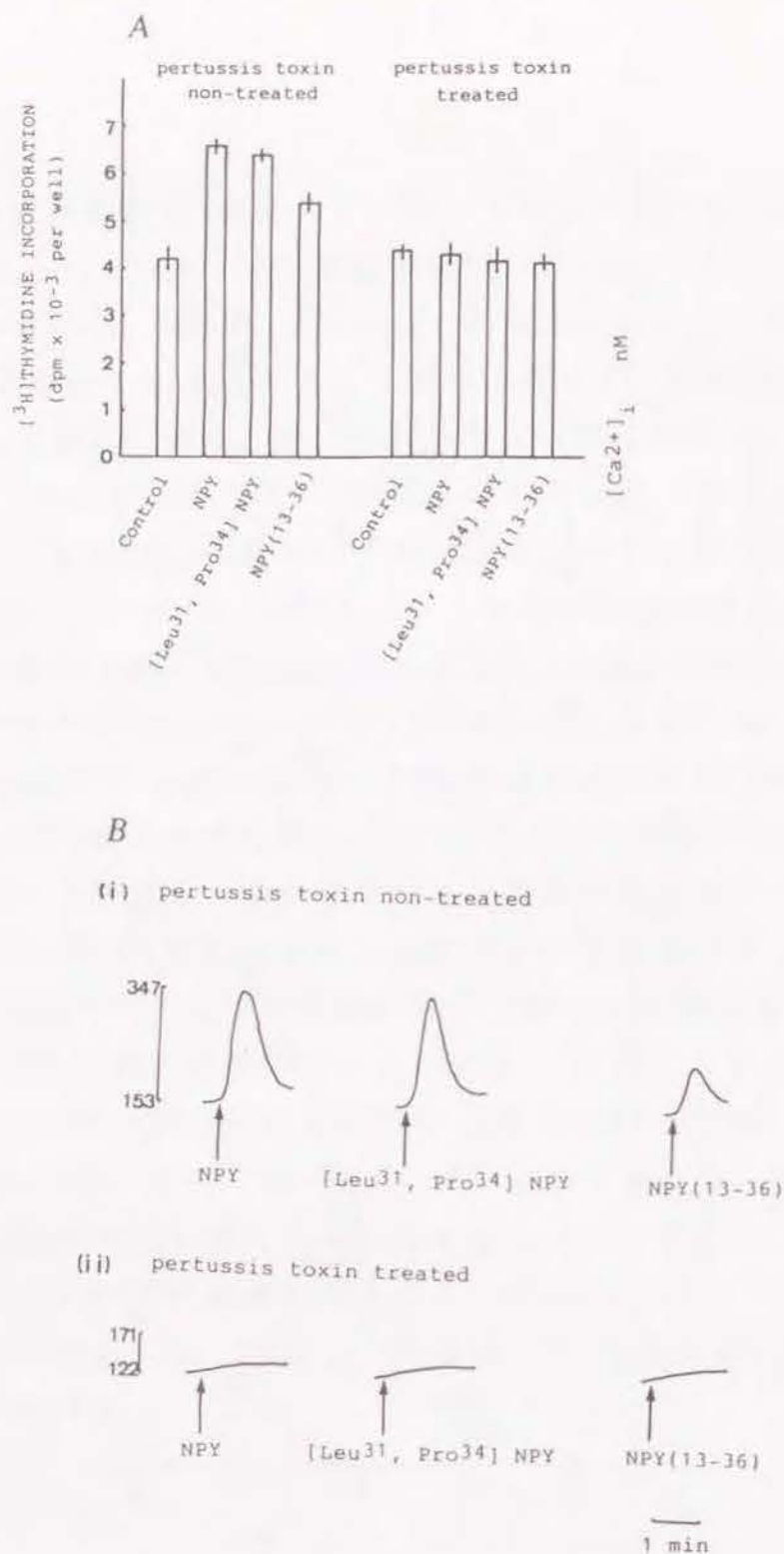


図3。(A)NPYのDNA合成促進作用に対するPTXの影響。
(B)NPYの細胞内Ca²⁺濃度上昇作用に対するPTXの影響。
それぞれの値=平均値±SEM
P-NPY, [Leu31, Pro34]NPY, NPY(13-36)は10⁻⁶Mを加えた。

考察

NPYは強力な血管収縮因子であることはよく知られている。従って、先に述べたような理由で、NPYはDNA合成を促進する可能性が考えられた。今回の実験では、NPY単独ではDNA合成促進作用は認められなかったが、細胞周期のG1期からS期に移行する際のプログレッション因子であるインスリン^(7, 8)を添加した時に、NPYは血管平滑筋細胞に作用してDNA合成を促進することがわかった。つまりNPYは細胞周期のG0期からG1期に移行する際の、コンピテンス因子として働いていることが示唆された。またNPYのDNA合成促進作用と細胞内Ca²⁺濃度上昇作用のEC50値は10⁻⁸Mであり、第3章の結合実験から得られたKi値の3.5±1.1nMとよく合った値であった。NPYのDNA合成促進作用は5%ウシ胎児血清によるDNA合成促進作用のわずか5%であったが、in vivoではNPYが持続的に放出されることを考慮すると、この数値は生理的に意味のある現象であると考えられる。また神経伝達物質や血管作動性ペプチドの細胞増殖作用は、成長因子に比べてかなり小さいことが知られている。例えば平滑筋細胞では、AIIやETはそれぞれ無刺激時の約80%と65-150%のDNA合成促進作用を示している^(9, 10)。NPYは今回の実験では、無刺激時の、約51-105%のDNA合成促進作用が観察された。次に受容体に特異的なNPY関連ペプチドを用いて、NPYの平滑筋におけるDNA合成促進作用が、どの受容体タイプを介しているか調べた。これらのペプチドのDNA合成促進作用は、細胞内Ca²⁺濃度上昇作用とよく一致していた。つまりY1受容体特異的なアゴニストである[Leu31, Pro34]NPYはNPYと同程度の促進作用があった。一方Y2受容体のアゴニストであるNPY(13-36)はNPYよりもはるかに活性が低く、数百分の1であった。以上の結果から、平滑筋細胞でのNPYのDNA合成促進作用は、細胞内Ca²⁺濃度上昇作用と同様にY1受容体を介することが示唆された。その上NPYのDNA合成促進作用と細胞内Ca²⁺濃度上昇作用は、細胞をPTX処理することにより消失す

ることから、どちらもPTX感受性のGTP結合タンパク質⁽¹¹⁾とカップルしていることがわかった。これまでの結果からDNA合成促進作用が起こるためには、細胞内Ca²⁺濃度上昇が必要であるのかどうかはつきりとした答えは得られていないが、トロンボキサンA₂やETやトロニンビンやインスリン様成長因子の場合の様に、DNA合成促進には、細胞内Ca²⁺上昇作用が必須である場合が多い⁽¹²⁻¹⁴⁾。

以上の結果から、今回血管平滑筋細胞に対してNPYがDNA促進作用を持つことが確認された。この作用はY₁受容体を介して、PTX感受性のGTP結合タンパク質を経由して行われていることがわかった。つまりNPYは交感神経刺激時に起こるような、動脈硬化現象に深く関わっている可能性があると考えられる。

文献

- 1) Lundberg, J., Rudehill, A., Sollevi, A., Theodorsson-Norheim, E. and Hamberger, B. Frequency- and reserpine-dependent chemical coding of sympathetic transmission: differential release of noradrenaline and neuropeptide Y from pig spleen. *Neurosci. Lett.*, 63(1986) 96-100
- 2) Cruickshank, J. and Smith, J. The beta-receptor, atheroma and cardiovascular damage. *Pharmacol. Ther.*, 42(1989)385-404
- 3) Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis-an up date. *N. Eng. J. Med.*, 314(1986)488-500
- 4) Hanley, M. Mitogenic neurotransmitters. *Nature*, 340 (1989)97
- 5) Ross, R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J. Cell. Biol.*, 50(1971)172-186
- 6) Hanasaki, K., Nakano, T. and Arita, H. Receptor-mediated mitogenic effect of thromboxane A₂ in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.*, 40(1990)2535-2542
- 7) Dicker, P. and Rozengurt, E. Phorbol esters and vasopressin stimulate DNA synthesis by a common mechanism. *Nature*, 287(1980)607-612
- 8) Scher, C., Antoniades, H. and Stiles, C. Platelet-derived factor and the regulation of the mammalian fibroblast cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta*, 560(1979)217-241
- 9) Araki, S., Kawahara, Y., Kariya, K., Sunako, M., Tsuda, T., Fukuzaki, H. and Takai, Y. Stimulation of

platelet-derived growth factor-induced DNA synthesis by angiotensinII in rabbit vascular smooth muscle cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 168(1990)30-35

- 10) Nakaki, T., Nakayama, M., Yamamoto, S. and Kato, R.
Endothelin-mediated stimulation of DNA synthesis in vascular smooth muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 158(1989)880-883

- 11) Birnbaumer, L., Abramowitz, J. and Brown, A.
Receptor-effector coupling by G proteins. Biochim. Biophys. Acta, 1031(1990)163-224

- 12) Chambard, J., Paris, S., Allemain, G. and Pouyssegur, J.
Two growth factor signalling pathways in fibroblasts distinguished by pertussis toxin. Nature, 326(1987) 800-803

- 13) Komuro, I., Kurihara, H., Sugiyama, T., Takaku, F. and Yazaki, Y.
Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. FEBS Lett., 238(1988)249-252

- 14) Takasu, N., Takasu, M., Komiya, I., Nagasawa, Y., Asawa, T., Shimizu, Y. and Yamada, T.
Insulin-like growth factor I stimulates inositol phosphate accumulation, a rise in cytoplasmic free calcium and proliferation in cultured porcine thyroid cells. J. Biol. Chem., 264(1989) 18485-18488

総合結論

本研究はブタ中膜平滑筋，ブタ培養平滑筋細胞とヒト神経腫瘍細胞SK-N-MCを用いて、NPYのY1タイプの受容体の結合部位の性質と、その情報伝達系の解明のために行われた。

まず末梢タイプの受容体が発現していると予想されたブタ中膜平滑筋の膜画分を用いて、中枢タイプの受容体が発現していることが良く知られていたブタ海馬膜画分の結合部位と比較することにより、末梢タイプ受容体の結合部位の解析を行った。その結果陽イオン感受性，GTPアナログの感受性，NPYアナログの親和力，NPYのC末端フラグメントの親和力などが中枢タイプの受容体とは異なっていることを初めて明らかにした。またNPYのC末端フラグメントの親和力から、平滑筋に存在するNPY受容体はいわゆるY1受容体と言われているものと性質が一致することが判明した。

次にY1受容体を介した情報伝達系をさらに詳しく解析するために、すでに知られていたcAMP産生抑制以外の系について検討を加えた。一般に平滑筋の収縮を考える上で細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は不可欠である。そこで細胞内 Ca^{2+} 濃度変化に対するNPYの影響を調べた。その結果NPYは細胞内のプールから Ca^{2+} を動員して、一過性に細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇を起こすことがわかった。その際 Ca^{2+} の細胞内動員を引き起こすと考えられる、イノシトール1, 4, 5三リン酸の産生上昇は検出されなかった。つまりNPYはいままでに考えられているメカニズムとは異なった作用で、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を起こすことが示唆された。またNPYの作用は細胞をPTX処理すると消失することから、NPYの受容体はPTX感受性のGTP結合タンパク質とリンクしていると考えられた。

次にNPYのアナログを用いて、NPYによる細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇はY1タイプの受容体を介していることを明らかにした。そのY1受容体について、NPYのファミリーの一つである、PPについて調べたところ、

RPPは作用せず、APPはアゴニストとしての働き、HPPはアンタゴニストとしての作用を持つことが明らかとなった。

次にNPYのアンタゴニストを検索している過程で、ホルボールエステルがNPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用を特異的に阻害することを見いだした。そこでホルボールエステルを用いて、NPYの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇作用と、cAMP産生阻害という二つの情報伝達系に関する機構を解析することが可能であると考え、研究を行った。結果、 Ca^{2+} 動員効果の方がホルボールエステルの感受性が高いことがわかった。受容体と結合しているGTP結合タンパク質がホルボールエステルの作用点であることを示唆する結果が得られた。そこで二つの情報伝達系には異なるGTP結合タンパク質がリンクしていることが示唆された。NPYにリンクしているGTP結合タンパク質は一般にPTX感受性であることが知られていた。そこでPTX感受性を調べたところ、やはり Ca^{2+} 動員の方が感受性が高かったので、Y1受容体には異なるGTP結合タンパク質がカップルしていることが支持された。

交感神経を低頻度刺激した場合、プレシナプスから放出される神経伝達物質は主にNEである。しかし高頻度でかつ連続的な刺激を行った時に放出される神経伝達物質はNPYであることが知られている。このような持続的な強い交感神経への刺激は、一種のストレス状態が加わっていることを示している。このようなストレス状態での血管活動を、NPYが制御している可能性が考えられる。ストレスは動脈硬化の主要要因であることが知られている。動脈硬化の引き金は、平滑筋が血管内膜に遊走し、増殖をおこすことである。そこでNPYが血管平滑筋細胞に対して増殖作用があるかどうかを調べた。その結果NPY単独ではDNA合成促進作用が認められなかったが、細胞周期のG1期からS期に移行する際のプログレッション因子であるインスリンを添加した時に、NPYのDNA合成促進作用が確認された。つまりNPYは細胞周期のG0期からG1期に移行する際のコンピテンス因子として働いていることが示唆された。またNPYアナログとPTXを用いた実験から、NPYの細胞増殖促進作用はY1受容体とPTX感受性のGTP結合タンパク質

を介した作用であることがわかった。

以上の様に、末梢の血管活動はNPYで多彩に制御され、その作用はY1受容体を介して行われていることが明らかとなった。そこでY1受容体のアンタゴニストは、新たな作用機構を持った高血圧と動脈硬化治療薬になる可能性があると考えられる。現在NPYのアンタゴニストはいくつか知られているが、特異性と安定性を考えるといずれも治療薬とはほど遠いものである。今回の実験結果を参考にすることにより、Y1受容体アンタゴニストの迅速なアッセイが可能であると考えられる。

謝辞

本研究に際し終始御助言と御指導を賜った、塩野義製薬研究所 藤本正文博士、三原伸一氏に深く感謝いたします。またペプチドの合成法を指導して頂いた、塩野義製薬研究所 伊賀野憲一氏、井上健博士に感謝いたします。本研究を行う際に、多大な御協力を頂きました塩野義製薬研究所 原真里子氏、板崎孝二氏に感謝いたします。

また本論文作成にあたり終始貴重な御助言と御指導を頂いた京都大学工学部上原悌次郎教授に深く感謝いたします。

発表論文

- (1)Shin-ichi Mihara, Yasushi Shigeri and Masafumi, Fujimoto.
Neuropeptide Y-induced intracellular Ca^{2+} increases in
vascular smooth muscle cells. FEBS Lett., 259(1989)79-82
- (2)Shin-ichi Mihara, Yasushi Shigeri and Masafumi, Fujimoto.
Neuropeptide Y receptor in cultured vascular smooth
muscle cells: ligand binding and increase in cytosolic
free Ca^{2+} . Biochem. Int., 22(1990)205-212
- (3)Yasushi Shigeri, Shin-ichi Mihara and Masafumi Fujimoto.
Neuropeptide Y receptor in vascular smooth muscle.
J. Neurochem., 56(1991)852-859
- (4)Yasushi Shigeri and Masafumi Fujimoto.
Two different signal transductions of neuropeptide Y1
receptor in SK-N-MC cells.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 187(1992)1565-1571
- (5)Yasushi Shigeri and Masafumi Fujimoto.
Neuropeptide Y stimulates DNA synthesis in vascular
smooth muscle cells. Neurosci. Lett., 149(1993)19-22

本学位論文に含まれていない発表論文

- (1)Yasushi Shigeri, Tokuzo Nishino, Noboru Yumoto and
Masanobu Tokushige.
Hopanoid biosynthesis of *Zymomonas mobilis*.
Agric. Biol. Chem., 55(1991)589-591
- (2)Kazuo Kawasaki and Yasushi Shigeri.
Injection of mRNA from pancreas and brain induce
different types of CCK receptors in *Xenopus* oocytes.
Soc. Neurosci. Abstr., (1991)320-17
- (3)Yasushi Shigeri, Sachihiko Watanabe and
Masafumi Fujimoto. Dibutyl- α -cAMP increases functions of
5-hydroxytryptamine $_2$ receptors, but not of β 2-adrenergic
receptors, in a clonal cell line of rat neurotumor RT4.
J. Cell. Physiol., 150(1992)28-33
- (4)Masafumi Fujimoto, Shin-ichi Mihara, Yasushi Shigeri and
Koji Itazaki. Possible implication of peptidase activity
in different potency of angiotensins II and III for
displacing [^{125}I]angiotensin II binding in pig aorta.
Eur. J. Pharmacol., 215(1992)259-264
- (5)Yasushi Shigeri, Kunio Yamaoka and Teiji Kamihara.
Formation of acetate upon heating glucose solution
in alkali: Identification of one of the growth-promoting
factors for *Streptococcus faecalis* in the thermal
degradation products of glucose.
Biosci. Biotech. Biochem., 56(1992)1684-1685
- (6)Itazaki Koji, Yasushi Shigeri and Masafumi Fujimoto.
Molecular cloning and characterization of the
angiotensin receptor subtype in porcine aortic smooth